

ISOLIERUNG, QUANTIFIZIERUNG UND
LOKALISATION
VON CALMODULIN
IM MENSCHLICHEN SPERMA

Irmgard Maria Hoffmann



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr.med. Dr.med.h.c. O. Braun-Falco

ISOLIERUNG, QUANTIFIZIERUNG UND LOKALISATION VON
CALMODULIN IM MENSCHLICHEN SPERMA

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Irmgard Maria Hoffmann

aus

Augsburg

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. W.-B. Schill

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr.med. Dr.med.h.c.
O. Braun-Falco
2. Prof. Dr.med. W. Neupert

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr.rer.nat. E. Toepfer-Petersen

Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.1987

Im Andenken an meine Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung.....	1
II. Ziel der Arbeit.....	2
III. Literaturübersicht.....	3
III.1. Vorkommen von Calmodulin.....	3
III.2. Struktur des Calmodulin.....	6
III.2.1. Primärstruktur.....	6
III.2.2. Sekundärstruktur.....	8
III.3. Struktur-Funktionsbeziehung.....	12
III.3.1. Calcium-Bindungseigenschaften.....	12
III.3.2. Interaktion durch Konformationsänderungen.....	13
III.3.3. Interaktion mit Antagonisten und Enzymen.....	17
III.4. Calmodulin-abhängige Enzyme und Bindungsproteine.....	19
III.4.1. Phosphodiesterase.....	19
III.4.2. Adenylatcyclase.....	19
III.4.3. Phosphorylase-Kinase.....	21
III.4.4. NAD-Kinasen.....	21
III.4.5. Phospholipase A	22
III.4.6. Calcium ATPasen.....	23
III.4.7. LMM-Kinasen.....	24
III.4.8. ATPase katalysierte Bewegungsprozesse.....	25
III.5. Calmodulin in Spermatozoen und im Seminalplasma.....	27
IV. Eigene experimentelle Untersuchungen.....	31
IV.1. Herstellung eines spezifischen Antiserums.....	31
IV.2. Vorbereitung der Proben.....	32
IV.2.1. Trennung der Ejakulate in Spermatozoen- und Plasma- fraktion.....	32
IV.2.2. Darstellung der Prostatomen.....	32
IV.2.3. Gelchromatographie der Membranvesikel.....	33

IV.3. Messungen mittels des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	33
IV.3.1. Titerbestimmung des Anti-Calmodulin-Serums.....	34
IV.3.2. Erstellung der Eichkurve.....	34
IV.3.3. Erstellung der Verdrängungskurve.....	35
IV.3.4. Messung des Calmodulin-Gehaltes in Spermatozoen und im Seminalplasma.....	35
IV.4. Messungen mittels des Radio Immuno Assay (RIA).....	36
IV.4.1. Erstellung der Verdrängungskurve.....	36
IV.4.2. Messung des Calmodulin-Gehaltes in Spermatozoen und im Seminalplasma.....	37
IV.4.3. Calmodulin-Bestimmung in Splitejakulaten.....	37
IV.4.4. Calmodulin-Bestimmung in den Prostatomen.....	37
IV.4.5. Calmodulin-Bestimmung im Serum.....	37
IV.5. Immunfluoreszenz.....	37
IV.6. Chromatographien.....	38
IV.6.1. CM-Cellulose.....	38
IV.6.2. Affi-Gel ^R Phenothiazin-Säule.....	38
IV.6.3. High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC).....	39
IV.6.3.a: Hochdruck-Gelfiltration.....	39
IV.6.3.b: Reversed-Phase.....	39
V. Versuchsergebnisse.....	40
V.1. Vorbereitende Untersuchungen.....	40
V.2. Gehalt an Calmodulin.....	45
V.2.1. in Spermatozoen und Seminalplasmen aus Human-Sperma..	45
V.2.2. in Seminalplasmen aus menschlichen Splitejakulaten...	51
V.2.3. in Prostatomenfraktionen aus menschlichem Seminal-plasma.....	52
V.2.4. im Serum.....	55
V.3. Lokalisation von Calmodulin in humanen Spermatozoen....	57
V.4. Extraktion von Calmodulin aus menschlichem Seminal-plasma.....	59

VI. Diskussion.....	69
VI.1. Mögliche Beteiligung von Calmodulin an Kapazitation und Akrosomreaktion.....	69
VI.2. Calmodulin und Motilität der Spermatozoen.....	72
VI.3. Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit der Ejakulate und dem Calmodulin-Gehalt.....	76
VI.4. Calmodulin im Seminalplasma.....	77
VI.5. Calmodulin in Prostatomen.....	79
VI.6. Calmodulin in Splittejakulaten	80
VII. Zusammenfassung.....	82
VIII. Literaturverzeichnis.....	85
IX. Danksagung.....	92
X. Lebenslauf.....	93

I. EINLEITUNG

Seit ungefähr 100 Jahren weiß man um die Bedeutung des Calcium-Ions für den lebenden Organismus. 1883 beobachtete der englische Physiologe RINGER, daß sich isolierter Herzmuskel nur in Gegenwart von Calcium kontrahiert. In der Folgezeit erkannte man, daß Calcium nicht nur für die Muskelkontraktion notwendig ist, sondern an fast allen physiologischen Zellvorgängen beteiligt ist, und zwar in ionisierter Form als Ca^{2+} .

So ist heute bekannt, daß Calcium eine wichtige Rolle bei Endo- und Exozytose, Zellmotilität, Chromosomenbewegung, bei intrazellulären Transportvorgängen, Glykogenstoffwechsel, Neurotransmittersynthese und -abgabe, bei Zellproliferation und den komplizierten Vorgängen der Befruchtung spielt. Jedoch blieb der biochemische Mechanismus dieser vielfältigen Calciumfunktionen bis vor kurzem ungeklärt.

Vor etwa 30 Jahren entdeckten japanische Wissenschaftler, wiederum beim Studium der Muskelkontraktion, ein "Calcium-bindendes Protein", das sie Troponin nannten. Eine Untereinheit dieses Proteins, Troponin C, bindet Ca^{2+} mit hoher Affinität, was zu einer Konformationsänderung des Troponins führt, wodurch dessen hemmender Einfluß auf die Muskelproteine aufgehoben wird und es zur Muskelkontraktion kommt. Troponin C war das erste bekannte Protein aus einer ganzen Familie strukturell ähnlicher, Calcium-bindender Proteine, zu denen auch Parvalbumin, LMM-Kinase und Calmodulin gehören.

II. ZIEL DER ARBEIT

Mit dieser Arbeit sollte nachgewiesen werden:

1. In welchen Mengen Calmodulin im menschlichen Sperma und in dessen verschiedenen Fraktionen vorkommt.
2. Es sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den gemessenen Werten und den klinischen Befunden der verwendeten Ejakulate besteht.
3. Die Lokalisation von Calmodulin im menschlichen Spermatozoon sollte bestimmt werden.
4. Calmodulin sollte aus menschlichen Seminalplasma isoliert werden.
5. Der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay sollte mit dem Radio Immuno Assay hinsichtlich Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit verglichen werden.

III. LITERATURÜBERSICHT

III.1. Vorkommen von Calmodulin

Calmodulin ist das am weitesten verbreitete und vielseitigste unter den Calcium-bindenden Proteinen. In allen eukaryonten Organismen mit Ausnahme einiger Hefen und Pilze fanden sich Proteine mit den funktionellen und biochemischen Eigenschaften von Calmodulin. TEO et al. (1973) und LIN et al. (1974) gewannen als erste reines Calmodulin aus Rinderherz- und -hirnextrakten. In der Folgezeit wurde Calmodulin aus neurosekretorischen Geweben vieler anderer Vertebraten gewonnen; Calmodulin ließ sich in peripheren Nerven, in Schilddrüsen- und Pankreasgewebe, in der Uterusmuskulatur, in Hodengewebe, in Skelettmuskel und Leber, in menschlichen Erythro- und Thrombozyten und in Fibroblasten- und Makrophagenzellen nachweisen.

Enzymatische Bestimmungen, Radioimmunoassay (RIA) und densitometrische Analysen ergaben weitgehend übereinstimmende Ergebnisse hinsichtlich des Calmodulin-Gehalts der oben genannten Gewebe. Die geringste Menge an Calmodulin wurde im Skelett- und Herzmuskel gemessen, wo Calmodulin zusammen mit anderen intrazellulären Calcium-bindenden Proteinen, meist Troponin C, vorkommt (GRAND et al. - 1979). Der höchste Calmodulin-Gehalt, nämlich 2-5% der Gesamtproteinmenge, wurde in einem Extrakt aus Zitteraalgewebe (*Electrophorus electricus*) gemessen (CHAFOULEAS et al. - 1979). In allen Geweben ist Calmodulin zwischen den löslichen und den Partikel-Fraktionen aufgeteilt, wobei die Konzentration von Calmodulin von der Calciumkon-

zentration während der Isolierung abhängt, und natürlich von der Art des Gewebes. Calmodulin findet sich frei im Zytoplasma oder an Membranen oder Organellen gebunden.

An subzelluläre Organellen gebundenes Calmodulin fand sich in Mikrosomen, Mitochondrien und im Zellkern. Im Gehirn entdeckte man eine relativ große Menge an Mitochondrien-assoziiertem Calmodulin, wobei aber nach weiterer Fraktionierung Calmodulin sich in den Synapsen fand, wo es entweder im Zytoplasma oder an die synaptische Membran und die synaptischen Mitochondrien gebunden vorkommt (GNEGNY et al. - 1977).

Dagegen wiesen CARAFOLI und Mitarbeiter 1980 nach, daß Calmodulin in gereinigten Mitochondrien nicht oder in nur sehr geringem Umfang vorhanden ist. Durch Peroxidase-Reaktion und Elektronenmikroskopie wurde Calmodulin in postsynaptischen Dendriten und dendritischen Neurotubuli lokalisiert (WOOD et al. - 1980). In "gap junctions" bindet sich Calmodulin an die dort vorhandenen Proteine, interessanterweise auch in Abwesenheit von Calcium (WELSH et al. - 1982).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Epitheloidzellen zeigten, daß Calmodulin in der mitotischen Spindel um die Zentriolen und Mikrotubuli angeordnet ist. Eine signifikante Bindung an Membranstrukturen konnte dabei ausgeschlossen werden (DE MEY et al. - 1980). In Übereinstimmung damit fand WILLINGHAM und Mitarbeiter (1982) Calmodulin in Interphasezellen nur im Zytosol, nicht in Membranen oder Mikrofilamenten. Jedoch läßt sich eine signifikante Bindung von Calmodulin an perinucleäre Strukturen nachweisen. Während der Mitose ereignet sich eine Umverteilung und Calmodulin findet sich hauptsächlich im Gebiet um den Zentriolenapparat (DE MEY et al. - 1980).

Ein ähnliches Verteilungsmuster ergaben Untersuchungen an lebenden Säugetierzellen, denen mit Rhodamin-Isothiocyanat beladenes Calmodulin injiziert wurde. In Interphasezellen erscheint hier Calmodulin-RITC im Zytoplasma nicht spezifisch angereichert. In mitotischer Teilung befindliche Zellen dagegen bauen Calmodulin-RITC schnell in die mitotische Spindel ein (ZAVORTINK et al. - 1983).

In den Einzellern *Tetrahymena pyriformis* und *Paramecium tetraurelia* ließ sich Calmodulin in deren Zilien und Geißeln nachweisen. Mit Hilfe Calcium-abhängiger Affinitätschromatographie wurde aus der Zilienproteinfraction von *Tetrahymena* Calmodulin gewonnen; auch in anderen Wimperntierchen entdeckte man Calmodulin nicht nur in den Zilien, sondern auch in den Basalkörperchen, aus denen die Zilien und Flagellen entspringen (KLUMPP et al. - 1983), also in Organellen, die für die Motilität verantwortlich sind.

Aus Säugetier- und Stachelhäuterspermatozoen (GARBERS et al. - 1980) wurde ein Protein isoliert, das sich aufgrund der Kenntnis des Molekulargewichts, des UV-Spektrums und der Aminosäuresequenz als Calmodulin identifizieren ließ. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von Calmodulin in Kaninchen- und Meerschweinchen-Spermatozoen bestimmt. Spermatozoen, die die Akrosomreaktion noch nicht durchlaufen hatten, zeigten vier Bereiche Calmodulinspezifischer Immunfluoreszenz: Rund um das Akrosom, bandförmig über dem unteren Drittel des Kopfes und am Ansatz und an der Spitze des Schwanzteiles. Im Gegensatz dazu war nach der Akrosomreaktion die Fluoreszenz an der vorderen Hälfte des Kopfes deutlich verschwunden, während das übrige Calmodulin-spezifische Verteilungsmuster erhalten blieb. Stattdessen war die

Fluoreszenz mit der Membran verbunden, die vom Spermienkopf abgetrennt worden war (JONES et al. - 1980). 1982 entdeckten BRADLEY und FORRESTER im Seminalplasma des Menschen und der Ratte ein Calcium-abhängiges Protein, das dem Calmodulin sehr ähnelte und das sie Calsemin nannten. Calsemin wurde als Glykoprotein identifiziert und kommt - im Gegensatz zu Calmodulin - hauptsächlich extrazellulär vor. Weiterhin fanden BRADLEY und FORRESTER Calsemin in der Plasmamembran von ejakulierten Rattenspermatozoen, was zu der Vermutung Anlaß gab, dieses ebenfalls Calcium-abhängige Regulatorprotein stehe in direktem Zusammenhang mit Spermienmotilität und Akrosomreaktion. STEGMAYR und RONQUIST isolierten 1982 aus dem Seminalplasma des Menschen eine Membranvesikelfraktion, die einen stimulierenden Effekt auf die Motilität menschlicher Spermien hatte. Aus diesen Membranvesikeln, die auch Prostatosomen genannt werden, wurde mit Hilfe von RIA und ELISA das Calcium-bindende Protein Calmodulin nachgewiesen (KRASSNIGG et al. - 1983).

III.2. Struktur von Calmodulin

Calmodulin ist ein Protein, bestehend aus einer Kette von 148 Aminosäureresten. Die Kette besitzt vier einander sehr ähnliche Bereiche, wobei jeder dieser Bereiche eine Calcium-Bindungsstelle besitzt.

III.2.1. Primärstruktur

Aminosäuresequenzanalysen von Vertebraten-, Protozoen- und Pflanzen-Calmodulin zeigten, daß dieses Pro-

tein im Laufe der Evolution fast keine Veränderung seiner Primärstruktur erfuhr. Die Sequenzanalyse des Säugetier-Calmodulins aus Rinderhirn und -uterus, Rattenhoden und der d-Untereinheit der Phosphorylase-Kinase aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens, sowie entsprechende Untersuchungen an Muschel- und Seeanemonen-Calmodulin, ergaben einen nur geringen Unterschied in der Aminosäuresequenz. Außerdem unterschied sich das Calmodulin-Molekül in den verschiedenen Geweben nur durch wenige Aminosäuren.

Die einzigen, bisher bekannten Unterschiede zwischen Vertebraten- und Non-Vertebraten-Calmodulin bestehen im Austausch von Glutamin gegen Lysin in Position 143 und im Austausch von Alanin gegen Serin in Position 147. Diese Differenzen haben mit größter Wahrscheinlichkeit keinen Einfluß auf die spezifischen Funktionen des Proteins. Neuere Erkenntnisse ergaben, daß Glutamin-143 zusammen mit sechs anderen Aminosäuren verantwortlich für die Antigenizität des Vertebraten-Calmodulin sind (VAN ELDIK et al. - 1981).

Aus dem Protozoon *Tetrahymena pyriformis* isoliertes Calmodulin unterscheidet sich von Calmodulin aus Metazoen durch die Aminosäurezusammensetzung und durch den Austausch von mindestens einem Methionyl-Rest (JAMIESON et al. - 1979). Dieses Calmodulin besitzt an mindestens 11 Positionen andere Aminosäuren als das Protein aus Vertebraten (YAZAWA et al. - 1981). Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz des Calmodulins aus *Tetrahymena pyriformis* sind nichtkonservative Substitutionen. Der Austausch an Position 135, Histidin für Glutamin, soll dabei am bedeutendsten sein, da dieser eine Stelle betrifft, die wahrscheinlich zu einem Teil der vierten Calcium-Bindungsstelle gehört.

Die oben beschriebenen strukturellen Unterschiede zwischen *Tetrahymena pyriformis*- und Metazoon-Calmodulin sind von besonderem Interesse. Nach Beobachtungen von KAKIUCHI und Mitarbeiter (1981) wird die Guanylatcyclase aus *Tetrahymena pyriformis* durch Calmodulin aus *Tetrahymena pyriformis* aktiviert, aber nicht durch Calmodulin aus anderen Geweben. Sollte sich dies bestätigen, wäre dies der erste Fall einer spezie-spezifischen Calmodulin-Funktion. Calmodulin aus *Tetrahymena pyriformis* unterscheidet sich dagegen nicht signifikant vom Vertebraten-Protein in seiner Fähigkeit, Phosphodiesterase aus Rinderhirn zu aktivieren, was beweist, daß die entsprechenden Säurereste, die die Bindungsstelle für dieses Enzym bilden, erhalten geblieben sind.

III.2.2. Die Sekundärstruktur

Die Sekundärstruktur von Calmodulin wurde von KRETSINGER 1976 beschrieben, der sie aufgrund kristallographischer Studien ermittelte. Ausgehend von der Struktur des Parvalbumins, einem Calcium-bindenden Protein mit einer mit Calmodulin beinahe übereinstimmenden Aminosäuresequenz, gelangte er zu folgendem Modell (Abbildungen 1 und 2)

1. Die spezifischen Calciumbindungsstellen in sich strukturell sehr ähnelnden Calcium-bindenden Proteinen bestehen aus "Helix-Loop-Helix"- oder "Hand"-Strukturen (Abb. 2).
2. Die Aminosäuresequenz kann in vier strukturell verwandte Teile oder Domänen aufge-

teilt werden (Abb. 1). Jede dieser Domänen besitzt Abschnitte, die für die Ausbildung einer "Hand"-Struktur (Abb. 2) nötig sind, so daß sich vier "Helix-Loop-Helix"-Untereinheiten ergeben.

3. Die "Loops" oder Schleifen bestehen aus 12 Aminosäureresten von denen sechs wahrscheinlich Sauerstoffbrücken zu Calcium ausbilden.
4. Die Sauerstoffatome der Calcium-bindenden Aminosäuren gruppieren sich so, daß sie annähernd die Ecken eines Octaeders bilden. Diese Bindungsstellen werden x, y, z und -x, -y, -z genannt.

Die S-Carboxylgruppe von Aspartat ist dabei der potenteste Sauerstoffdonator. Jedoch besitzen auch die Carboxylseitenkette der Glutaminsäure, der Carbonylsauerstoff von Asparagin, Glutamin und Serin oder Threonin-Hydroxylgruppen wahrscheinlich eine Bindungsstelle.

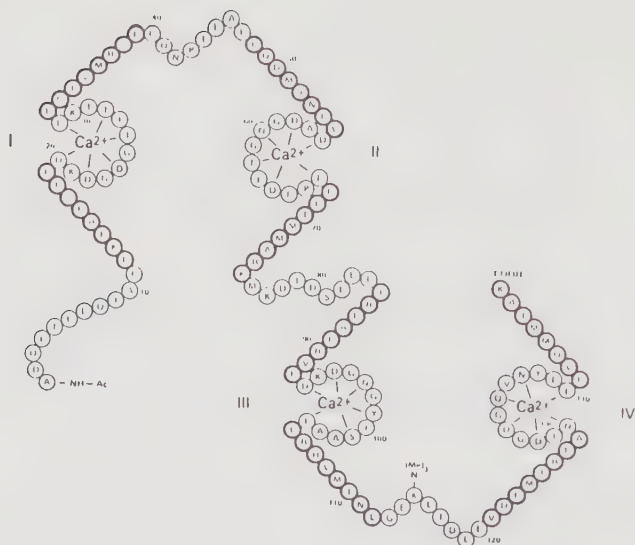


Abb. III.1. Schematische Darstellung von CALMODULIN
(Aus KLEE et al. - 1980)

Die vier Calciumbindungsschleifen (I-IV) und die
(halbfettgedruckten)-Helices eines Vertebraten-Calmo-
dulin-Moleküls.



Abb. III.2. "Handstrukturmodell" nach KRETSINGER
(Aus KRETSINGER - 1976)

Der Zeigefinger in der Ebene der Figur, sei eine alpha-Helix, die Finger III, IV und V seien die Calcium-Bindungsschleife und der Daumen als zweite alpha-Helix stehe senkrecht zur Ebene der Figur. KRETSINGER nannte die alpha-Helix Nummer 5 des Parvalbumins, im Modell durch den Zeigefinger symbolisiert, Helix-"E", die durch den abduzierten Daumen dargestellte Helix, Helix-"F", so daß diese Struktur auch "EF-Hand" genannt wird. Allgemeine Gültigkeit wird dieser Hypothese durch die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Vitamin D-abhängigen, Calcium-bindenden Proteins aus Rinderdarm durch SZEBENYI verliehen (SZEBENYI et al. - 1981).

III.3. DIE FUNKTION VON CALMODULIN UND IHR EINFLUSS AUF DIE STRUKTUR

III.3.1. Calcium-Bindungseigenschaften

Zusätzlich zu den bereits angeführten vier spezifischen Calcium-Bindungsstellen, deren Existenz durch Untersuchungen an zahlreichen Calmodulin-Molekülen aus Vertebraten bestätigt wurde, fanden sich einige, weniger spezifische Calcium-Bindungsstellen, denen jedoch keine physiologische Bedeutung zugemessen wird.

Die vier Calcium-Bindungsstellen binden Calcium spezifisch bei physiologischen Konzentrationen von Kalium (0,1 M) und Magnesium (1-3 mM) und unterscheiden sich in ihren Bindungseigenschaften voneinander. Dabei besteht eine positive Zusammenarbeit hinsichtlich der Calcium-Bindung zwischen der ersten und der zweiten Bindungsstelle (HAIECH et al. - 1981). Natrium-NMR-Studien über die Calmodulin- und Na-Bindung an Calmodulin ergaben, daß das N-terminale Peptid (1-77) höhere Affinität zu Calmodulin und anderen Ionen besitzt als das COOH-terminale Peptid (78-148) (DELVILLE et al. - 1980). Also werden die Bindungsstellen der I. und II. Domäne die größere Ionen-Affinität besitzen. Dagegen beobachteten REID und Mitarbeiter 1980, daß sich die Affinität der Bindungsstellen für Calcium und Magnesium in Gegenwart eines aromatischen Restes an den Positionen 7 und/oder 10 der Bindungsschleife erhöhte, was bei der III. und IV. Bindungsschleife des Calmodulin-Moleküls der Fall ist. HAIECH veröffentlichte 1981 folgende Ergebnisse: Die Bindung für Calcium geschieht in bestimmter Rei-

henfolge; die vier Calcium-spezifischen Bindungsstellen binden Calcium, Magnesium und Kalium kompetitiv; in Abwesenheit von Calcium besitzt eine der vier Bindungsstellen eine signifikant höhere Affinität für Calcium als für Magnesium und Kalium (HAIECH - 1981). Insgesamt konkurrieren Kationen unterschiedlicher Affinität um die Bindungsstellen, wobei die Erdmetalle Tb, Nd und Pr deutlich höhere Affinität als Calcium-Ionen beobachten ließen und biologisch-aktive Komplexe bildeten (WALLACE et al. - 1982).

Einfluß auf die Bindung von Calcium besitzen vor allem die Ionenstärke, die Mg-Konzentration, der pH-Wert und die Temperatur, wobei ersichtlich wird, daß die oft unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Calcium-Bindung eine Erklärung in diesen Zusammenhängen gefunden haben (OGAWA et al. - 1984). Die Calmodulin-Bindung an das Calmodulin-Molekül ist bei pH-Werten unter 6 deutlich abgeschwächt und wird durch mono- oder divalente Kationen beeinflusst. Die Dissoziationskonstanten (10^{-6} bis 10^{-5} M) sind vereinbar mit der physiologischen Rolle des Calmodulin als Übermittler von Calciumsignalen an verschiedene Effektorproteine.

III.3.2. Interaktion durch Konformationsänderungen

Die Fähigkeit von Calmodulin als Calcium-abhängiger Regulator der Enzymaktivität zu wirken, wird durch Strukturveränderungen hervorgerufen, die auf der Calcium-Bindung beruhen. Seit bekannt ist, daß sich weder das Molekulargewicht noch die hydrodynamischen Eigenschaften von Calmodulin verändern, wird angenommen, daß diese Bindungen aus einer Konformationsände-

rung resultieren, die von spezifischen Reaktionszentren gesteuert wird.

Spektroskopische Untersuchungen gaben Aufschluß über die Calcium-induzierten, strukturellen Veränderungen in der COOH-terminalen Kette des Calmodulin-Moleküls, welches in der dritten und vierten Bindungsschleife an den Positionen 99 und 138 je einen Tyrosyl-Rest besitzt. Spektralanalysen zeigten in Übereinstimmung dazu, daß Calcium-induzierte Veränderungen sich in der Umgebung von Tyrosyl- und Phenylalanin-Resten abspielen (KILHOFFER et al. - 1981). Die meisten Beobachtungen erstreckten sich auf die COOH-terminale Kette; die identischen Veränderungen müssen für die ersten beiden Bindungsstellen am N-terminalen Teil des Moleküls angenommen werden. Diese sind jedoch wegen laborchemischer Schwierigkeiten noch wenig untersucht. Die alpha-Helix der ersten Domäne soll im Calcium-freien Protein teilweise entfaltet sein. Die Hauptveränderungen, die durch Calcium im UV-Spektrum hervorgerufen werden, und die Zunahme der durch Calcium verursachten Tyrosin-Fluoreszenz (KUO et al. - 1976) sind vor der Sättigung aller Calcium-Bindungsstellen zu beobachten. Es wird daher vermutet, daß nach der Bindung von einem oder zwei Calcium-Atomen eine Konformationsänderung des Calmodulin-Moleküls stattfindet. Die Übereinstimmung zwischen den Veränderungen in der Umgebung von aromatischen Aminosäureresten und dem Grad der Calcium-Sättigung des Calmodulin-Moleküls weisen daraufhin, daß die oben erwähnten Konformationsänderungen der kooperativen Bindung von Calcium an die ersten beiden zu besetzenden Stellen folgt (CROUCH et al. - 1980) McCUBBIN fand Veränderungen im UV-Spektrum, die er der Besetzung der verbleibenden zwei Bindungsstellen zurechnete (McCUBBIN et al. - 1979).

Wenn die Calcium-Bindung an Calmodulin schrittweise erfolgt, ist sie wahrscheinlich auch an eine bestimmte Reihenfolge gebunden. Gleichermäßen wie bei der Calcium-Besetzung der beiden Bindungsstellen mit hoher Affinität, zeigte sich nach Zugabe von 2 mol Tb^{3+} ein deutlicher Anstieg der Tyrosin-Fluoreszenz (WALLACE et al. - 1982). Die Bindung des dritten Tb-Ions ließ die Tyrosin-Fluoreszenz verschwinden und einen riesigen Anstieg der Tb-Lumineszenz erkennen, was als Ergebnis eines Energietransfer-Mechanismuses angesehen wird. Diese Beobachtungen gelten als Beweis für die Vermutung, daß das dritte Tb-Ion mit einer tyrosinhaltigen Bindungsstelle, wie der dritten oder vierten, reagiert.

Die Interaktion von Calmodulin mit seinen Reaktionspartnern benötigt in der Mehrzahl der Fälle Calcium. Mn und Sr sind ebenfalls in der Lage, mit Calmodulin zu reagieren, aber erst bei ca. 10fachen Konzentrationen, verglichen mit der Calcium-Konzentration (PIASCIK et al. - 1980).

Experimente mit hohen Konzentrationen an Phosphatdiesterase, Myosinkinase und Calcineurin zeigten, daß die Affinität dieser Proteine für Calcium-freies Calmodulin sehr gering ist (ADELSTEIN et al. - 1981). Die Affinität der Phosphorylase-Kinase zu Calmodulin wird durch Calcium verändert, obwohl die Reaktion der beiden Proteine auch in Abwesenheit von Calcium sehr gut verläuft (PICTON et al. - 1980). KAKIUCHI und Mitarbeiter berichteten 1981, daß Calmodulin mit Zellmembranen unabhängig von der Calcium-Konzentration reagiert.

Andere Proteine, wie Histone, Proteine der Myelinscheide und die katalysatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase reagieren mit Calmodulin aufgrund ihrer hohen positiven Ladung. Die phy-

siologische Bedeutung dieser offensichtlich unspezifischen, elektrostatischen Interaktion ist noch unbekannt (ITANO et al. - 1980). In den meisten der untersuchten Fälle bildet Calmodulin mit den entsprechenden Enzymen einen stöchiometrischen Komplex. Bei diesen Enzymen handelt es sich entweder um Monomere, wie die LMM-Kinase, Dimere wie die Phosphodiesterase, Oligomere oder aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzte Enzyme wie die Phosphorylase-Kinase. Calmodulin reagiert prinzipiell mit der katalytischen Untereinheit seines Reaktionspartners. Da viele Proteine Monomere sind, existiert keine universelle, Calmodulin-bindende Untereinheit. Die meisten Beobachtungen ergaben, das Calmodulin nur aus zwei Teilen bestehende, Calcium-abhängige Komplexe bildet. Die Reaktion mit einem Protein kann die Reaktion mit einem anderen verhindern (KLEE et al. - 1980).

Die bisherigen Ergebnisse weisen daraufhin, daß unterschiedliche Proteine oder Proteinklassen unterschiedliche Bindungsstellen besitzen bzw. unterschiedliche Konformationsänderungen derselben Bindungsstelle bewirken. Die These, daß durch Calcium-Anlagerung an Calmodulin auf dessen Oberfläche hydrophobe Bezirke freigelegt werden, die wiederum Aktivierungsvorgänge auslösen, erscheint aus heutiger Sicht nicht mehr zuzutreffen (LAPORTE et al. - 1980).

Modifikation z.B. an den Lysyl-Resten verändert die Fähigkeit des Proteins mit Phosphodiesterase zu reagieren, die Fähigkeit zur Aktivierung der Adenylatcyclase bleibt dagegen unberührt. Andererseits beeinflußt eine Modifikation der Arginin-Reste die Aktivierung der Adenylatcyclase, nicht jedoch die Phosphodiesterase-Aktivierung (THIRY et al. - 1980).

Peptid 78-148 kann mit TroponinI reagieren oder Phosphorylase-Kinase mit verminderter Affinität aktivieren, während die Peptide 107-148 und 1-106 beinahe inaktiv sind (KUZNICKI et al. - 1981). Die beiden aminoterminalen Domänen (1-84) mit ihrer, unter den verschiedenen Calmodulin-Molekülen universellen, Säuresequenz könnten die bedeutendsten Proteinbindungsstellen beinhalten.

VAN ELDIK und Mitarbeiter beobachteten 1983, daß das Heptapeptid Asn-Tyr-Glu-Glu-Phe-Val-Glu-NH₂, das den Aminosäuren 137-143 des Vertebraten-Calmodulin entspricht, ebenso immunreaktiv ist, wie das gesamte Calmodulin-Molekül. Dieses Heptapeptid ist das kleinste Calmodulin-Segment und die einzige aus sieben Teilen bestehende Sequenz in der Region der Aminosäuren 135-145, das eine quantitative Immunreaktion mit Anti-Calmodulin-Serum zeigt. Die Sequenz aus sieben Aminosäuren bewirkte im RIA eine Verdrängungskurve, die beinahe mit der entsprechenden Kurve des gesamten Proteins übereinstimmt.

III.3.3. Interaktion mit Antagonisten und Enzymen

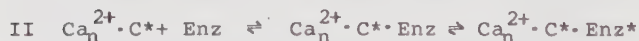
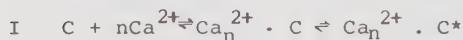
Komplexbildung und Aktivierung wird üblicherweise durch Phenothiazine gehemmt, deren Affinität zu Calmodulin durch Calcium wesentlich erhöht wird. Es zeigte sich, daß die Affinität der Phenothiazine zu Calmodulin in direktem Zusammenhang mit ihrer Hydrophobizität steht (ROUFOGALIS-1981). Von vielen hydrophoben Verbindungen weiß man heute, daß sie in Anwesenheit von Calcium mit Calmodulin reagieren und dessen stimulatorischen Effekt mildern. Unbekannt ist noch, ob die Enzyme und das Phenothiazin die gleiche

Bindungsstelle besitzen. NMR-Studien ergaben, daß die Trifluoperazin-Bindung in zwei Schritten, vermutlich an zwei verschiedenen Bindungsstellen, erfolgt (KLEVIT et al. - 1981). Nach KLEVIT sind die Phenothiazin-Bindungsstellen in den F-Helices der II. und IV. Domäne angesiedelt.

Auch antihypertensive Pharmaka reagieren mit Calmodulin, wenn auch nur schwach, und setzen dabei dessen Calcium-Bindungsfähigkeit herab (BOSTRÖM et al. - 1981).

Eine Aktivierung der Calmodulin-abhängigen Enzyme wird durch Calcium bewirkt, wobei sich Calmodulin einer Konformationsänderung unterzieht. Es ist anzunehmen, daß die Calmodulin-abhängige Enzymaktivierung aus zwei einzelnen Schritten besteht:

Bindung (I) und Isomerisierung (II)
Gleichungen (WOLFF et. al. - 1979)



III.4. Calmodulin-abhängige Enzyme und Bindungsproteine

III.4.1. Phosphodiesterase

Die Rolle des Calmodulin als Aktivator der Phosphodiesterase, die den Abbau des 3' - 5' -cAMP zu 5-AMP katalysiert, wurde 1970 von CHEUNG beschrieben. Die Bedeutung dieser Interaktion ist bis heute noch unbekannt, da die Aufgabe der Calmodulin-abhängigen Form der Phosphodiesterase nicht bestimmt werden konnte. Unter den verschiedenen Formen der Phosphodiesterase stimuliert Calmodulin allein die Calcium-abhängigen Enzyme, wobei zur Aktivierung anscheinend Calmodulin- Ca_4^{2+} oder Calmodulin- Ca_3^{2+} benötigt wird. (COX et al. - 1981). Auch existieren noch keine genauen Angaben über die Anzahl der Calcium-Ionen, die für die Interaktion des Enzyms mit Calmodulin benötigt werden. Kinetische Studien über die Calmodulin-Aktivierung der Phosphodiesterase führten zu der Erkenntnis, daß der riesige Calcium-abhängige Affinitätsanstieg des Enzyms zu Calmodulin aus dem 10- bis 20fachen Anstieg der Calcium-Affinität zu dem Enzym-Calmodulin-Komplex resultiert. Phosphodiesterase wird also nicht als freies Enzym, sondern als Komplex vorkommen, dessen Aktivierungsgrad hauptsächlich vom Grad der Calcium-Diffussion abhängt.

III.4.2. Adenylatcyclase

Die Adenylatcyclase, die für die cAMP-Synthese verantwortlich ist, wird durch Calmodulin-Calcium aktiviert. Die Adenylatcyclase stellt einen Komplex von

Enzymen dar, die in der Oberflächenmembran fast aller Zellen vorkommen. Der Calcium- und Hormon-abhängige Anstieg des cAMP's in Gliazellen weist dem Calmodulin eine physiologische Rolle in der Nucleotid-Synthese zu. Aber auch limitierte Proteolyse aktiviert die Adenylatcyclase und zieht den Verlust der Calmodulin-Calcium-Abhängigkeit nach sich (KELLER et al.-1980). Verschiedene durch Calmodulin aktivierte Systeme werden durch Proteasen in ähnlicher Weise beeinflusst, wie z.B. die Phosphodiesterase, die LMM-Kinase ("myosin light chain kinase") und die Ca- und Mg-ATPase der Plasmamembran (NIGGLI et al. - 1981). Es scheint, daß diese und vielleicht auch andere Calmodulin-Calciumabhängigen Enzyme ähnliche inhibitorische Polypeptidketten, verbunden mit katalytischen Untereinheiten, besitzen, wobei sich die inhibitorische Sequenz unter Komplexbildung mit Calmodulin von der katalytischen Sequenz ablösen kann und sie wie durch Proteolyse getrennt werden.

Der augenscheinliche Widerspruch, Calmodulin aktiviere sowohl den Aufbau als auch den Abbau von AMP, könnte ein Artefakt aus "in vitro"-Untersuchungen sein. In der Zelle wäre eine sequentielle Stimulation denkbar, wenn, wie angenommen, niedrigere Calcium-Konzentrationen für die Aktivierung der Adenylatcyclase erforderlich sind als für die Aktivierung der Phosphodiesterase. Weiterhin wird wahrscheinlich die Adenylatcyclase, da sie in einem anderen Kompartiment vorkommt, nämlich in der Zellmembran, zuerst stimuliert werden.

III.4.3. Phosphorylase-Kinase

Eine der vielleicht bedeutendsten Aufgaben des Calmodulin stellt die Calmodulin-abhängige Regulation des Enzyms Phosphorylase-Kinase dar. Phosphorylase-Kinase verfügt über eine zentrale Rolle im Glykogen-Stoffwechsel und wird durch Calmodulin in fast allen Geweben, sozusagen als ein universeller Stimulator, beeinflusst.

Die d-Untereinheit dieser Enzyme ist mit dem Calmodulin-Molekül auch anderer Säugetiere identisch, wobei jedoch die g-Untereinheit die Hauptbindungsstelle für Calmodulin darstellt. Diese g-Untereinheit repräsentiert wahrscheinlich den katalytisch aktiven Teil der Phosphorylase-Kinase, wobei Calcium die Enzymaktivität vermutlich durch direkten Eingriff in die Calmodulin-Enzym-Interaktion beeinflusst.

III.4.4. NAD-Kinasen

NAD-Kinasen katalysieren die ATP-abhängige Phosphorylierung des NAD zu NADP. Bis heute ist lediglich bekannt, daß Calmodulin in zwei Eukaryonten die NAD-Kinase durch Regulierung der intrazellulären Calciumkonzentration beeinflusst und die durch Calmodulin hervorgerufene Enzymaktivierung durch Trifluoperazin gehemmt werden kann. Diese Ergebnisse sind deshalb von so großer Bedeutung, da die Stimulierung der NADP-Biosynthese einen der Hauptschritte am Beginn der Befruchtung darstellt, die durch Calcium-Einstrom gesteuert werden.

III.4.5. Phospholipase A

Auch wird Calmodulin eine wichtige Rolle in der Prostaglandin-Biosynthese zugeschrieben. Calmodulin aktiviert die Calcium-abhängige Phospholipase A der Thrombozyten, woraus ein zwei- bis dreifacher Anstieg der Arachidonsäure resultiert (WALENGA et al.-1981). Des weiteren wird angenommen, daß die Menge an Arachidonat, der Vorstufe der Prostaglandine, durch die Phospholipase A₂ bestimmt wird, wodurch Calmodulin noch zusätzlich in die Prostaglandin-Synthese eingreift.

Drei Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, die Myosin-, Phosphorylase- und Glykogensynthetase-Kinase konnten bis heute charakterisiert werden und wurden bereits besprochen. Im Gegensatz zu cAMP-abhängigen Proteinkinasen sind die Calmodulin-abhängigen Kinasen meistens substratspezifisch, so daß verschiedene Typen einer Kinase aufgrund ihrer gewebeabhängigen Substratspezifität identifiziert werden konnten.

Calmodulin hemmt auch die Proteinphosphatase-Aktivität, indem es sich an Enzymsubstrate bindet. Dieser Vorgang ist nicht immer Calcium-abhängig und Troponin C kann Calmodulin in dieser Funktion ersetzen (WOLFF et al. - 1981). Eine Calcium-abhängige Proteinphosphatase (Pr.-Ph. 2B), die die α -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase und die LMM-Kinase dephosphoryliert, wurde aus Skelettmuskel isoliert (WALSH et al. - 1979). Auch hier kann die Calmodulin-Stimulation durch Trifluoperazin gehemmt werden. Möglicherweise sind jedoch Calcineurin, eines der Hauptbindungsproteine des Calmodulin im Gehirn, und Proteinphosphatase 2B identische Proteine.

III.4.6. Calcium-ATPasen

Aktivierung der Calcium-ATPase, bislang nur in der Erythrozytenmembran nachgewiesen, führt zu einer Stimulierung der Calcium-Pumpe und zur Calcium-Aufnahme in Membranvesikeln (WAISMAN et al. - 1981). Calmodulin-Inhibitoren wie Calcineurin und Phenothiazine hemmen sowohl die ATPase-Aktivität als auch die oben erwähnte Calcium-Aufnahme. Gelchromatographisch ließ sich Aufschluß über den Aktivierungsmechanismus gewinnen: Man kann davon ausgehen, daß die Aktivierung über die direkte Bindung des Calmodulin an die ATPase erfolgt (HINCKE et al. - 1984). Diese Erkenntnisse beweisen jedoch nicht, daß Calmodulin ein universeller Regulator der plasmamembranständigen ATPase ist oder eine physiologisch relevante Bedeutung besitzt, zumal bekannt ist, daß verschiedene Säugetierspezies eine ATPase aufweisen, die teilweise oder vollständig unempfindlich gegenüber Calmodulin ist.

Das sarkoplasmatische Retikulum vorwiegend des Herzmuskels enthält eine Calcium-ATPase, deren Aktivität sowohl durch die cAMP- als auch die Calcium-abhängige Phosphorylierung reguliert wird. Darüberhinaus könnte die ATPase-Aktivitätsänderung durch allosterische Änderungen, hervorgerufen durch divalente Kationen und Nucleotide, bewirkt werden. Die ATPasen in Skelett- und Herzmuskel wurden als 100000 Dalton Polypeptide identifiziert. Jedoch steht auch hier der Beweis für eine physiologische Bedeutung und die Kenntnis des genauen Wirkmechanismus noch aus.

III.4.7. LMM-Kinasen ("myosin light chain kinase")

LMM-Kinase, ein Calcium-abhängiges Enzym, katalysiert die Abspaltung des aktivierten Phosphors aus ATP und dessen Bindung an das Myosin. Das Enzym besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, die beide für sich keine signifikante enzymatische Aktivität besitzen. Die LMM-Kinase geht in Anwesenheit von Calcium eine 1:1-Verbindung mit Calmodulin ein und die Affinität des Enzyms zu Calmodulin steigt signifikant an. In Abwesenheit von Calmodulin ist die LMM-Kinase inaktiv. Sie benötigt sowohl Calcium als auch Calmodulin zur Aktivierung. Die Stimulation durch Calmodulin ist spezifisch und kann nicht durch homologe Calcium-bindende Proteine wie z.B. Troponin C ersetzt werden (WALSH et al. - 1980). Wie bei anderen Calmodulin-abhängigen Enzymen auch, kann die LMM-Kinase durch Phenothiazide gehemmt werden bzw. ist die Aktivierung durch Calmodulin ein reversibler Prozeß, der in einem ersten Schritt aus der Bindung von Calcium an Calmodulin und in einem zweiten Schritt aus der Interaktion des Calmodulin-Calcium-Komplexes besteht, gefolgt von einer Konformationsänderung des Enzyms, die zur Aktivierung führt.

In einigen Geweben wird die Aktivität der LMM-Kinase nicht nur durch den Calcium-Spiegel sondern auch durch Phosphorylierung beeinflusst. Die Phosphorylierung kann in Abwesenheit von Calmodulin an zwei getrennten Stellen erfolgen, was zu einer verminderten Enzymaktivität führt, die eine verminderte Affinität des Enzyms zu Calmodulin bewirkt (CONTI et al. - 1981).

III.4.8. ATPase-katalysierte Bewegungsprozesse

Eukaryote Organismen benutzen zwei unterschiedliche Systeme ATPase-katalysierter Bewegungsprozesse: Das Aktin-Myosin-System und das Dynein-Mikrotubuli-System, das für die Bewegung der Zilien und Geißeln verantwortlich ist. Auch die Motilität der Zilien und Geißeln kann durch Calcium beeinflusst werden. Calmodulin oder Calmodulin-ähnliche Proteine könnten dabei die Calcium-Anlagerung übermitteln, indem sie mit Proteinen im Zilium, die ATPase-Aktivität enthalten, reagieren. Jedoch ist weder die genaue Lokalisation der ATPase noch ihre Bedeutung für die ziliäre Bewegung hinreichend bekannt, so daß über die Aktivierung des Enzyms durch Calmodulin nur begrenzte Aussagen möglich sind.

Mikrotubuli sind Zellelemente, die für alle Arten der Zellbewegung verantwortlich sind: Zilien- und Geißeln-Motilität, intrazelluläre Transportprozesse, Chromosomenbewegung und axonaler Transport. Es ist möglich, daß Calmodulin mit den Proteinen der Mikrotubuli reagiert und umgekehrt. Bekannt ist die Anreicherung von Calmodulin im Spindelapparat während der mitotischen Teilung, wobei drei mögliche Funktionen von Calmodulin diskutiert werden: Erstens könnte Calmodulin direkt die Gruppierung und Degruppierung der Mikrotubuli in der Zentrosomenregion beeinflussen, zweitens könnte Calmodulin Aktomyosin regulieren und drittens auf die membranständigen Calciumpumpen Einfluß nehmen (MEANS et al. - 1980).

Insgesamt wurden eine ganze Reihe von Interaktionen zwischen Calmodulin und Zellelementen sowie Zellmembranen beobachtet. Die physiologische Rolle dieser Reaktionen bleibt jedoch bislang ungeklärt.

Bevor die Rolle von Calmodulin im Sperma besprochen wird, hier eine kurze Zusammenfassung der bisher geschilderten Vorgänge, in denen Calmodulin involviert ist:

Tabelle III.1. Calmodulin-abhängige Prozesse

Prozess	Reaktionspartner
Nukleotid-Metabolismus	Phosphodiesterase Adenylatcyclase
Protein-Phosphorylierung	Membranständige und zytoplasmatische Proteine
Bewegungsabläufe	LMM-Kinase in Skelettmuskel, Glattem Muskel und Fibrillen
Mikrotubulianordnung	
Glykogenmetabolismus	Phosphorylase-Kinase
Calcium-Flux	Ca^{2+} -Transport $[\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}]$ ATPase
Sekretion	im Neurotransmittersystem
Verbleibende Enzym-Systeme	NAD^{+} -Kinase Phospholipase A

III.5. Vorkommen von Calmodulin in Spermatozoen und im Seminalplasma

Calmodulin findet sich, wie bereits erwähnt wurde, im Säugetierspermatozoon an vier verschiedenen Stellen: 1) am Akrosom; 2) streifenförmig über dem unteren Drittel des Kopfes; 3) am Ansatzstück und 4) an der Spitze des Schwanzes. Nach erfolgter Akrosomreaktion läßt sich Calmodulin in der abgetrennten Akrosomkappe (JONES et al. - 1980) nachweisen.

Interessanterweise finden sich im Spermatozoon nicht nur Calcium-abhängige, Calmodulin-bindende Proteine, sondern auch solche, die mit Calmodulin nur in Abwesenheit von Calcium oder unabhängig davon reagieren. Alle drei Klassen dieser Calmodulin-bindenden Proteine wurden sowohl im Kopf- als auch im Schwanzteil nachgewiesen, ferner in den Membranen, Axonen und in den Dynein-Fraktionen (Proteine der Geißel, die ATPase-Aktivität enthält) (TASH et al. - 1983).

Die Fähigkeit der reifen Säugetierspermatozoen, eine koordinierte, vorwärtsgerichtete Bewegung auszuführen, hängt von der intrazellulären, freien Calciumkonzentration ab, die sich innerhalb eines kleinen Spielraumes bewegen darf. Im Falle der Plasmamembran des Schwanzstückes kann dies auf zwei Wegen bewerkstelligt werden: durch die ATP-verbrauchende Calciumpumpe und durch den Na/Ca-Austausch, ein gegenläufiges, enzymatisch geregeltes Transportsystem der Zellmembran. (Spermatozoen unterliegen aufgrund der hohen Na^+ -Konzentration im Seminalplasma einem ständigen Na^+ -Einstrom).

BRADLEY und FORRESTER (1980; FEBS LETTERS) stellten die Vermutung auf, daß der Großteil des Calciumtrans-

portes der Spermatozoenplasmamembran durch das Na/Ca-System geregelt wird, und die membranständige Calcumpumpe eine untergeordnete, wenn auch wichtige Rolle spielt. Ferner konnten BRADLEY und FORRESTER nachweisen, daß das Na/Ca-System durch Verapamil, einem Calmodulin-Antagonisten, gehemmt wird. Der Zusammenhang zwischen einer definierten Calciumkonzentration und der Spermatozoenmotilität steht im Einklang mit einer funktionellen Rolle von Calmodulin in diesen Prozessen, was durch die Entdeckung oben genannter Wissenschaftler unterstützt wird, daß das Seminalplasma Calmodulin oder ein Calmodulinähnliches Protein enthält, welches die $[Ca^{2+} + Mg^{2+}]$ -ATPase der Plasmamembran des Spermatozoenschwanzstückes stimuliert (BRADLEY et al. - 1980). In den sich im Nebenhoden befindlichen Spermatozoen ist diese als Calcumpumpe bezeichnete ATPase relativ inaktiv, wird aber während der Ejakulation aktiviert, vermutlich durch Anlagerung des eben erwähnten Calmodulin-ähnlichen Proteins.

Ein anderes Enzym des Spermatozoenschwanzstückes, das wahrscheinlich von Calmodulin reguliert wird, ist die Dynein-ATPase. Dynein ist das Hauptprotein der "Arme" der axonemalen Fibrillen und stellt eine Mg^{2+} und Ca^{2+} aktivierte ATPase dar (s. Abb. III.3. und Diskussion). Die Mg -abhängige Adenylatcyclase männlicher Keimzellen reagiert mit Calmodulin, wobei im Experiment nur eine geringe Stimulierung des Enzyms durch Calmodulin erzeugt werden konnte (GORDELAZDE et al. - 1982). Eine Inhibition wurde durch Psychopharmaka mit Ausnahme von Trifluoperazin erzielt; es ist jedoch noch nicht geklärt, ob sich diese Pharmaka mit Calmodulin oder direkt mit der Adenylatcyclase verbinden und so eine Aktivitätsverminderung herbeiführen.

Aus dem Seminalplasma des Menschen und der Ratte konnte eine Calcium-abhängige Proteinfraction isoliert werden, die Calsemin genannt wurde (BRADLEY and FORRESTER - 1982). In einigen Punkten sind Calsemin und Calmodulin identisch: sie stimulieren beide die Phosphodiesterase- und Ca-ATPase-Aktivität, welche durch Phenothiazine gehemmt werden kann; sowohl Calsemin als auch Calmodulin sind saure, hitzestabile Proteine mit niedrigem Molekulargewicht. Jedoch soll Calsemin ein Glykoprotein sein und hauptsächlich extrazellulär vorkommen.

Ob die beiden identisch sind oder ob es sich um zwei unterschiedliche Proteine mit verschiedener Wirkungsweise handelt, bleibt noch unbekannt (s. Diskussion).

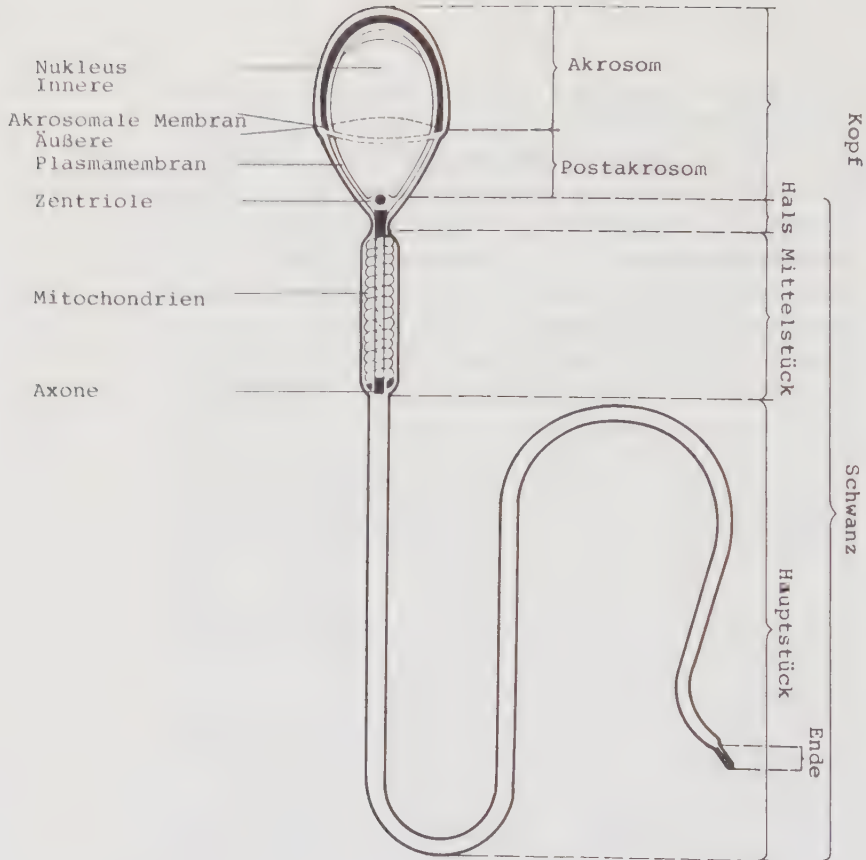


Abb. III. 3. Schematische Darstellung eines Spermatozoons

Das normal entwickelte Spermatozoon besitzt eine Länge von 50µm und besteht aus Kopf- und Schwanzteil. Der Kopf entspricht hauptsächlich dem Zellkern, das Akrosom liegt wie eine Kappe darüber. In der Halsregion beginnen die Axone, die sich durch das Mittelstück bis hin zum Ende des Hauptstückes ziehen. Sie bestehen aus 9 Fibrillenpaaren, die zylindrisch ein zentrales Fibrillenpaar umgeben. Im Mittelstück, das ungefähr die gleiche Länge wie der Kopfteil besitzt, sind die Mitochondrien und Zentriolen eingelagert. (Detaillierte Schilderung siehe Diskussion).

IV. EIGENE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

IV.1. Herstellung eines spezifischen Antiserums vom Kaninchen gegen Calmodulin

IV.1a: Derivatisierung des Antigens

Bovines Thyreoglobulin (bTG) wurde mit Bromcyan im alkalischen Milieu ($\text{pH} > 10,0$) digeriert; anschließend wurden $630 \mu\text{g}$ Calmodulin (vom Schwein, Boehringer Mannheim) an das aktivierte Zuckermolekül gebunden. Das derivatisierte Antigen wurde gelchromatographisch gereinigt (SEPHADEX G-10) und gefriergetrocknet.

IV.1b: Immunisierung des Kaninchens

1,4ml des in PBS gelösten Antigens wurde mit 1,4 ml komplettem Freud'schem Adjuvans emulgiert ($100 \mu\text{l}$ Emulsion = $22,5 \mu\text{g}$ Calmodulin). Die Emulsion wurde dem Kaninchen intradermal in die Nackenregion appliziert, jeweils $100 \mu\text{g}$ pro Boosterung. Komplettes Freud'sches Adjuvans fand nur bei der ersten Boosterung Verwendung; bei den nachfolgenden, wöchentlich durchgeführten Boosterungen wurde das gelöste Antigen in inkomplettem Freud'schem Adjuvans emulgiert und auf die gleiche Weise appliziert. Insgesamt wurden dem Kaninchen $2,0\text{mg}$ Calmodulin injiziert.

Nach Betäubung des Tieres mit NEMBUTAL ($10,0\text{mg/kg}$ Körpergewicht) gewann man durch Herzpunktion $65,0\text{ml}$ Serum.

IV.2. Vorbereitung der Proben

IV.2.1. Trennung der Ejakulate in Spermatozoen- und Plasmafraktion

1ml jedes Ejakulates wurde 10min bei 16000g zentrifugiert. Das Seminalplasma konnte danach abpipetiert werden; die am Boden befindlichen Spermatozoen wurden in 1ml PBS+0,5% BSA (8,0g NaCl; 0,2g KH_2PO_4 ; 1,437g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5,0g BSA auffüllen auf 1000ml mit Aqua dest.) aufgenommen und bei 1000rpm 10min zentrifugiert. Der dadurch erhaltene Überstand wurde mit PBS + 0,5% BSA auf das 3-4fache verdünnt und auf PBS+4%BSA gelayert, anschließend bei 2000-2500rpm 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit PBS/BSA gewaschen und in 1ml desselben Puffers aufgenommen.

IV.2.2. Darstellung der Prostatosomen

Die Membranvesikel wurden aus Ejakulaten (Lagerung bei 24°C) gewonnen. Nach dem Auftauen wurden die Proben 30min bei 1500g zentrifugiert. Der weitgehend durchsichtige Überstand, das Seminalplasma, wurde dann für 12h bei 106000g, Temperatur $4-8^\circ\text{C}$, in einer Beckmann L-2 präparativen Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer (50,0mM TRIS-HCl, pH 7,32, 138mM NaCl, 1mM MgCl_2) suspendiert und ein zweites Mal in der Ultrazentrifuge 6h zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in oben genanntem Puffer suspendiert. Der Proteingehalt dieser Suspension wurde nach LOWRY bestimmt und auf 5,0mg/ml mit oben genanntem Puffer eingestellt.

IV.2.3. Gelchromatographie der Membranvesikel

Für die Gelchromatographie wurden Prostrasomen, die wie oben beschrieben vorbereitet wurden, verwendet. Von den mit 0,05M TRIS-HCl-Puffer resuspendierten Prostrasomen wurde 1ml auf eine Sepharose 6B-Säule, mit einem Säulenvolumen von 84,78ml, aufgetragen. Eluiert wurde mit 0,05M TRIS-HCl-Puffer (pH 7,32). Das Elutionsdiagramm wurde wie folgt geeicht: Range: 0-2, $A_{280} \times \text{cm}$; Drive: $2,0 \text{ mm} \times \text{min}^{-1}$; Dauer einer Fraktion: 3min, (Calmodulin wurde im ELISA bei 492nm in ng/ml quantifiziert).

IV.3. Messungen mittels des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Dazu wurden auf einer Titertex-Platte das Antigen und 100 μl Coatingpuffer (1,59g Na_2CO_3 ; 2,93g NaHCO_3 ; 0,2g Merthiolat; auffüllen auf 1000ml mit Aqua dest.; pH 9,6) pro Loch aufgetragen und 24h bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (jeweils 15min) mit PBS-Tween-0,5%BSA-Puffer (8,0g NaCl ; 0,2g KH_2PO_4 ; 1,437g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5ml Tween 20; 5,0g BSA; auffüllen auf 1000ml mit Aqua dest., pH 7,2-7,4) wurde die Platte bei 37°C 15min mit gleichem Puffer inkubiert. Anschließend wurde der mit obigem Puffer verdünnte 1. Antikörper (Anti-Calmodulin-Serum) aufgetragen. Nach 24h Inkubationszeit (4°C) wurde die Platte nach der bereits erwähnten Methode dreimal gewaschen. Der zweite Antikörper (Anti-Rabbit-IgG, Boehringer, mit Peroxidase gekoppelt) wurde in einer Verdünnung von 1:500 auf die Platte aufgetragen (100 μl pro Loch) und 4h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte dreimaliges Waschen mit obigem Puffer, sowie einmal Waschen mit

Aqua dest. Als Substrat für die Peroxidase diente OPD in Zitronensäurepuffer (4,62 g Zitronensäure, wsfr.; 7,24g Na_2HPO_4 , wsfr.; ad 1000ml Aqua dest.; pH 5,0) verdünnt: 10ml Puffer auf 20mg OPD+7 μl H_2O . Davon wurden 100 μl pro Loch aufgetragen und 15min bei 22°C inkubiert. Anschließend wurde mit 50 μl 4,5n H_2SO_4 gestoppt. Die Extinktionswerte wurden bei 432nm im Photometer abgelesen.

Alle Messungen im ELISA wurden nach diesem Schema durchgeführt; Antigen und 1. Antikörper variieren in den verschiedenen Messungen und werden bei deren Beschreibung gesondert angegeben.

IV.3.1. Titerbestimmung des Calmodulin-Antiserums

Als Antigen wurden auf eine Titertex-Platte 0,05 μg Calmodulin (Schwein, Boehringer) aufgetragen. Verdünnungen des Calmodulin-Antiserums (1; 1/2; 1/4; 1/8;1/1024; als Kontrolle PBS) wurden als 1. Antikörper verwendet, jeweils 100 μl pro Loch. Alle weiteren Schritte erfolgten wie unter IV.3. beschrieben.

IV.3.2. Erstellung der Eichkurve

Zur Auswertung der abgelesenen Extinktionswerte wurde eine Eichkurve angefertigt. Dazu beschickte man eine Titertex-Platte mit Verdünnungen des Schweine-Calmodulins (Boehringer), als Antigen ausgehend von 0,1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ bis zu einer Verdünnung von 1/1024. Als 1. Antikörper dienten 100 μl Calmodulin-Antiserum pro Loch. Die erhaltenen Meßwerte wurden in graphischer Form aufgetragen. Jede durchgeführte Messung auf einer Titertex-Platte enthielt eine Eichkurve.

IV.3.3. Erstellung der Verdrängungskurve

Auf Titertex-Platten wurde als Antigen 1 µg Schweine-Calmodulin (Boehringer) pro Loch gegeben. Danach erstellte man, ausgehend von einer Stammlösung von 200 µg Schweine- bzw. Human-Calmodulin/ml Verdünnungen (1/2.....1/1024). Das Calmodulin-Antiserum wurde 1/100 verdünnt. Jeweils 100 µl der einzelnen Calmodulin-Verdünnungen und 100 µl des verdünnten Antiserums wurden vereinigt und 24h bei 4 ° C inkubiert. Die so erhaltenen 200µl pro Verdünnung wurden auf die Platte als 1. Antikörper aufgetragen und 24h bei 4 ° C gehalten.

IV.3.4. Messung des Calmodulin-Gehaltes in Spermatozoen und Seminalplasma

Die Spermatozoonfraktionen wurden in TRIS-Puffer homogenisiert, 5min auf 95 °C erhitzt und anschließend bei 16000g zentrifugiert. Vom Überstand wurden für die Messung im ELISA 1/4 Verdünnungen mit Coating-Puffer angefertigt.

Die Seminalplasmen wurden 5min auf 95 ° C erhitzt und 15min bei 16000g zentrifugiert. Anschließend wurden 1/4 Verdünnungen mit TRIS-Puffer angefertigt. Es wurden jeweils 100 µl Verdünnung pro Loch als Antigen aufgetragen und 100 µl Coating-Puffer dazugegeben. Der 1. Antikörper, Calmodulin-Antiserum, wurde 1/200 verdünnt. Für jede Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, die beiden pro Probe erhaltenen Extinktionswerte gemittelt, der Leerwert (PBS-Kontrolle) abgezogen und nach Ablesen des Calmodulingehaltes mittels der Eichkurve diesen im Fall der Spermatozoonfraktion mit 4 multipliziert, im Fall der Plas-

mafraktion mit 10, um die Verdünnungseffekte auszugleichen.

IV.4. Messungen mittels des Radio Immuno Assay (RIA)

Verwendet wurde: Calmodulin ¹²⁵J RIA KIT, Firma NEN, Katalog Nr.: NEK-018.

Im NEN Calmodulin RIA KIT stellt mit ¹²⁵J beladenes Calmodulin den "Tracer" dar; ein hochspezifisches Calmodulin-Antiserum vom Schaf den ersten Antikörper.

Die Messung wurde wie folgt durchgeführt: Pro Probe wurden 100 µl Probe + 100 µl "Tracer" + 100 µl des ersten Calmodulin-Antikörpers zusammengegeben und mindestens 16h bei 4°C inkubiert. Danach wurden 500µl des zweiten Antikörpers dazugegeben, mindestens 30min inkubiert und 15 min bei 5000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Proben in einem Gamma-Counter ausgewertet.

Nach der dem KIT beigelegten Arbeitsanleitung wurde ebenfalls eine Eichkurve angefertigt.

IV.4.1. Erstellung der Verdrängungskurve

Ausgehend von einer Stammlösung von 200µg Human-Calmodulin/ml wurden Verdünnungen (1/2..... 1/1024) hergestellt. Das dem NEN Calmodulin RIA KIT entnommene Schaf-Antiserum wurde 1/100 verdünnt. Jeweils 100 µl der Calmodulin-Verdünnungen und 100µl des verdünnten Antiserums wurden vereinigt und bei 4°C 24h inkubiert. Die so erhaltenen 200 µl pro Verdünnung wurden als erster Antikörper in dem System eingesetzt.

IV.4.2. Messung des Calmodulin-Gehaltes in Spermatozoen und Seminalplasma

Die Spermatozoenfraktionen wurden in TRIS-Puffer homogenisiert, 5min auf 95 ° C erhitzt und anschließend bei 16000g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 1/4-Verdünnungen mit dem dem NEN Calmodulin RIA KIT beigefügten Assay-Puffer angefertigt.

Das Seminalplasma wurde ebenfalls für 5 min auf 95 ° C erhitzt und 15min bei 16000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Assay-Puffer 1/4 verdünnt.

IV.4.3. Calmodulin-Bestimmung in Splittejakulaten

Das Seminalplasma der Fraktionen I und II von Splittejakulaten wurde wie oben beschrieben erhitzt und zentrifugiert. Die Proben wurden anschließend mit Assay-Puffer 1/4 verdünnt.

IV.4.4. Calmodulin-Bestimmung in den Prostatasomen

Die aus Seminalplasma gewonnenen Prostatasomen (siehe IV.2.2.) wurden mit Assay-Puffer 1/4 verdünnt und der Messung im RIA unterzogen.

IV.4.5. Calmodulin-Bestimmung im Serum

Seren von "Normalpersonen" und polytraumatisierten Patienten wurden unverdünnt, 100 µl pro Probe, im Calmodulin RIA eingesetzt.

IV.5. Immunfluoreszenz

Die Spermatozoen wurden wie in IV.5. beschrieben gereinigt, hier jedoch unter Verwendung von PBS-Puffer

ohne BSA, auf Objektträger ausgestrichen und 15min in 100% Methanol fixiert. Danach wurde als erster Antikörper 100µl der unverdünnten IgG-Fraktion des Kaninchen-Antiserums (gewonnen durch Affinitätschromatographie; Protein-A-Sepharose) aufgetragen und 12-14h bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und 100µl Anti-Kaninchen-IgG (Firma Boehringer) in einer 1:80-Verdünnung daraufgegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde nochmals mit PBS dreimal gewaschen und eingedekelt. Die Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop wurden 20sec belichtet. Zur Kontrolle wurden

1. PBS als erster Antikörper und
2. Normales Kaninchen Serum als erster Antikörper eingesetzt.

IV.6. Chromatographien

IV.6.1. CM-52-Cellulose-Säule (Whatman, Springfield),
Säulenvolumen 10,0*2,0 cm

Es wurden 30-50ml Seminalplasma direkt aufgetragen und mit Phosphatpuffer (50mM, pH 7,2) nachgewaschen.

IV.6.2. Affi-Gel Phenothiazin-Säule (BioRad, München)
Säulenvolumen 0,7*5,0cm.

10ml Lyophilisat (1mg Calmodulin/ml) wurden aufgetragen, die Säule mit Applikationspuffer (300mM NaCl; 100µM CaCl₂; 1mM 2-Mercaptoaethanol; 50mM Tris pH 7,5) nachgewaschen und Calmodulin mit EGTA-Puffer (5mM EGTA; 50mM Tris pH 7,5) eluiert.

IV.6.3. High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC)

IV.6.3a: Hochdruck-Gelfiltration

TSK-125, TSK-250, TSK-400 (BioRad, München) wurden in Serie geschaltet, das Säulenvolumen betrug 300 x 7,5 mm; aufgetragen wurden 200 µl.

Eluent: 0,02M Phosphat pH 7,4; 0,2M Na₂SO₄; 1mM PMSF;
Durchfluß: 1ml/min; 1ml/Fraktion;

Detektion: 275µm

IV.6.3b: Reversed Phase, HP 318 (BioRad, München)

Das Säulenvolumen betrug 250 x 4,6mm, aufgetragen wurde 1ml.

Eluent: PufferA: 0,1% Trifluoressigsäure in H₂O,
PufferB: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril.

Gradient: in 60min von 5 auf 60% B

Durchfluß: 1ml/min; 1 ml/Fraktion

Detektion: 275µm

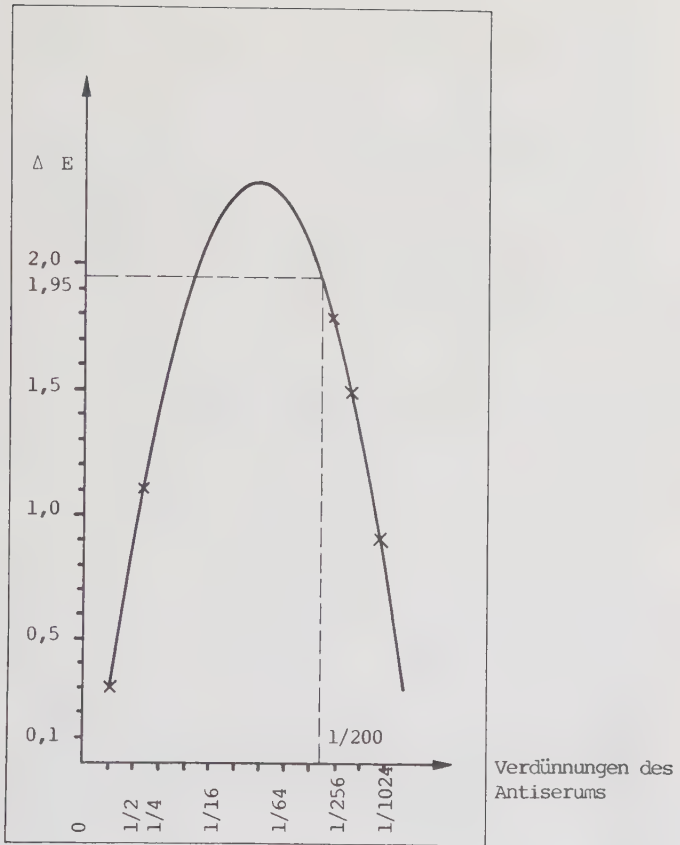
V. ERGEBNISSE

Wie bereits im vorigen Kapitel aufgeführt, wurden Calmodulin und Calmodulin-ähnliche Proteine in Spermatozoen und im Seminalplasma aus Säugetierejakulaten entdeckt, wobei Untersuchungen am menschlichen Ejakulat weitgehend ausgespart blieben. Es sollte deswegen zunächst die Menge an vorhandenem Calmodulin in verschiedenen Fraktionen des humanen Ejakulates nachgewiesen werden.

V.I. Vorbereitende Untersuchungen

Zur Vorbereitung dieser Messungen waren einige Untersuchungen notwendig:

Zunächst wurde der Titer des Kaninchens-Antiserums bestimmt, das durch Boosterung eines Kaninchens mit aufbereitetem, bovinem Calmodulin gewonnen worden war (s. IV.1.). Da Calmodulin ein sehr konservatives Protein ist, mußte die Antigenizität des Proteins verändert werden. Dies geschah durch Derivatisierung: Calmodulin wurde an die Zuckermoleküle von Dinitrofluorbenzol, das zuvor mit bovinem Thyreoglobulin umgesetzt worden war, gebunden. Zur Titerbestimmung wurde die sehr empfindliche Methode des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) angewendet. Die Kurve der Titerbestimmung zeigte die klassische Hyperbelform; der Titer betrug 1/200 (s. V.1.).

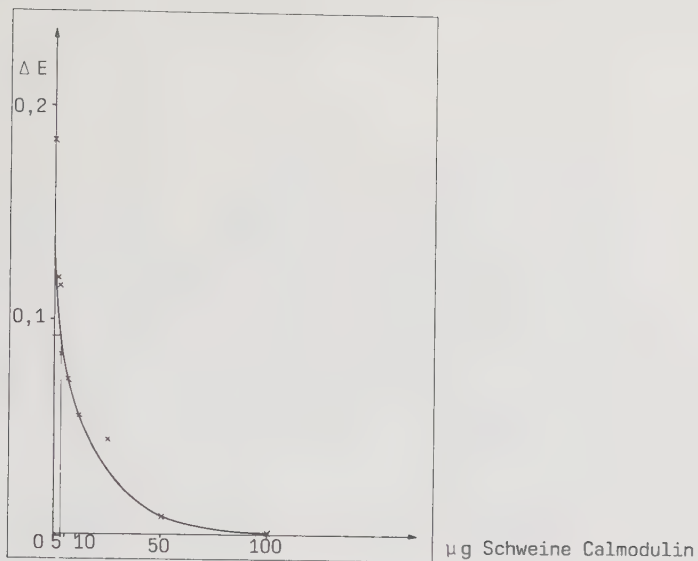


Kurve V. 1:

Titerbestimmung des Anti-Calmodulin-Serums, ELISA

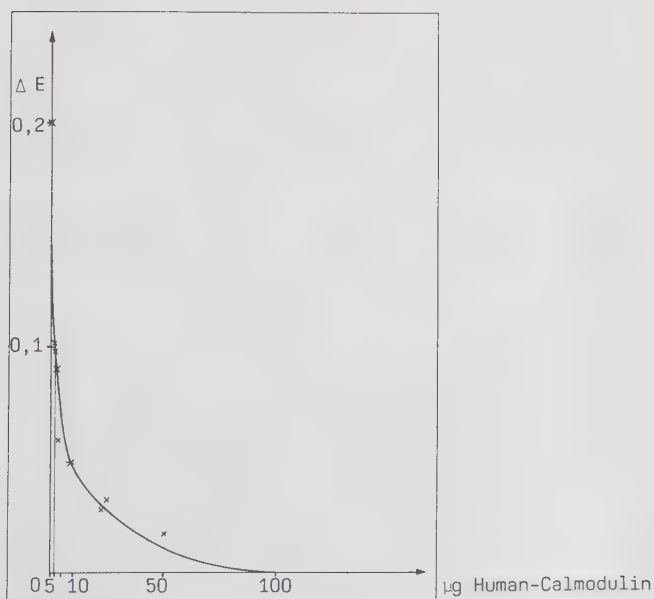
Des weiteren benötigte man den Nachweis, daß das Antiserum sowohl gegen Schweine- als auch gegen Human-Calmodulin gerichtet ist, da im ELISA mittels bovinem Anti-Calmodulin (oben genanntes Serum) die Menge an humanem Calmodulin der Proben ermittelt werden sollte. Zu diesem Zweck wurden Verdrängungskurven angefertigt. Dabei wurden verschiedene Verdünnungen von Schweine- und Human-Calmodulin mit immer derselben Verdünnung des Antiserums inkubiert und diese Lösung als erster Antikörper im ELISA eingesetzt (s. IV.3.). Je höher die Konzentration an Schweine- bzw. Human-Calmodulin, desto geringer die verbleibende Menge an Antikörpern des Antiserums; und desto weniger konnten die noch "freien" Antikörper die vorgegebene Menge an Calmodulin im ELISA binden. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse siehe Kurven V.2. und V.3. Die beiden Kurven sind in ihrem Verlauf nahezu identisch. Der 50%-Inhibitionswert bei Schweine-Calmodulin-Verdünnungen und Human-Calmodulin-Verdünnungen, die beide bovines Antiserum (vom Kaninchen) "blockierten", ließ sich bei 3µg Schweine-Calmodulin und bei 2µg Human-Calmodulin ermitteln. Das durch Boosterung eines Kaninchens gewonnene Antiserum reagiert also in beinahe gleichem Ausmaß mit bovinem und humanem Calmodulin. Damit kann das Antiserum in den folgenden Messungen eingesetzt werden und liefert vergleichbare Ergebnisse.

Da die Menge an Calmodulin in den Proben auch mittels des Radio Immuno Assays (RIA) bestimmt werden sollte, wobei Schaf-Antiserum gegen humanes Calmodulin gerichtet wurde, wurde analog eine Verdrängungskurve erstellt, unter gleichem Vorgehen wie oben beschrieben (s. Kurve V.4.).



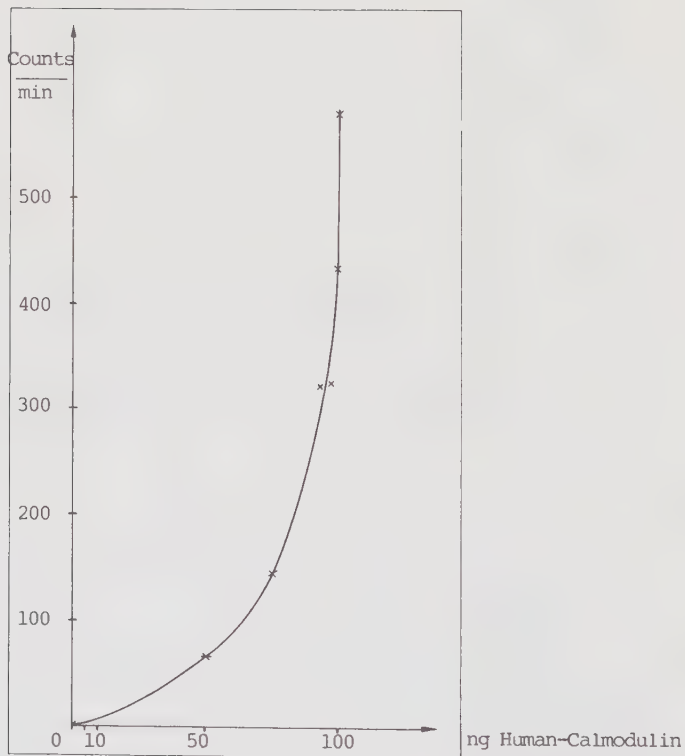
Kurve V.2.

Verdrängungskurve Schweine-Calmodulin ELISA



Kurve V.3.

Verdrängungskurve Human-Calmodulin ELISA



Kurve V.4.:

Verdrängungskurve Human-Calmodulin RIA

Calmodulin gehört zu der Gruppe der hitzestabilen, sauren Proteine. Um die zu messende Calmodulin-Menge des Seminalplasmas in Relation zu der Gesamtkonzentration der sauren Proteine des sehr proteinreichen Seminalplasmas setzen zu können, bestimmte man aus einem Pool von Seminalplasmen den Gehalt an deren sauren Proteinen. Die Fraktion der sauren Seminalplasmaproteine wurde durch Ionenaustauscherchromatographie (CM-Cellulose) gewonnen; das Eluat wurde 5min auf 95°C erhitzt und anschließend einer Proteinbestimmung mit dem BioRad-Test unterzogen. Dabei ergab sich ein Gehalt an sauren Seminalplasmaproteinen von 11mg/ml Seminalplasma.

V.2.1. Gehalt an Calmodulin in Spermatozoen und Seminalplasma aus Human-Sperma

Wie eingangs erwähnt, interessierte der Gehalt an Calmodulin und Calmodulin-ähnlichen Proteinen in den verschiedenen Fraktionen des humanen Ejakulates. Es wurden daher 80 Ejakulate in Spermatozoen- und Plasmafraktionen aufgetrennt und in ihnen sowohl im RIA als auch im ELISA die Calmodulin-Menge bestimmt. Dabei ergaben sich folgende Mittelwerte:

	<u>Spermatozoen</u>	<u>Seminalplasma</u>
RIA	2,26ng/10 ⁶ Spermatozoen	30,38ng/100 µl
ELISA	2,39ng/10 ⁶ Spermatozoen	27,22ng/100 µl

Die gemessenen Werte im einzelnen siehe Tabelle V.1. Wie deutlich zu sehen ist, stellt Calmodulin unter den sauren Seminalplasmaproteinen nur einen geringen Teil dar. Jedoch enthält das Seminalplasma das 11-13fache an Calmodulin, verglichen mit der Spermatozoenfraktion.

Tabelle V.1.

Ejakulat-Nr.	<u>Spermatozoen</u>		<u>Seminalplasma</u>	
	(ngCalmodulin/10 ⁶ Sperm.)		(ngCalmodulin/100 µl)	
	RIA	ELISA	RIA	ELISA
1	(20,5)	(28,2)	12,8	13,0
2	3,1	2,7	32,0	33,0
3	0,9	4,5	20,0	17,0
4	(17,4)	(20,5)	(80,0)	25,0
5	1,1	5,4	46,0	44,0
6	0,8	0,7	24,0	13,0
7	1,5	1,9	23,2	13,0
8	-	-	20,0	14,0
9	3,5	2,9	26,0	25,0
10	0,6	0,3	32,0	32,0
11	1,0	1,0	-	32,0
12	0,5	2,0	24,0	24,0
13	4,9	7,7	36,0	34,0
14	1,1	1,3	12,8	15,0
15	0,5	0,8	12,8	10,0
16	0,8	2,6	8,4	18,0
17	-	-	12,0	30,0
18	8,5	7,7	24,0	(120,0)
19	0,3	1,2	36,0	36,0
20	0,5	2,9	(80,0)	25,0
21	0,7	0,4	34,0	28,0
22	4,1	0,8	22,8	13,0
23	0,2	2,5	22,4	20,0
24	-	-	19,2	13,0
25	0,1	0,5	(80,0)	24,0
26	4,1	6,7	46,0	39,0
27	5,9	1,1	46,0	44,0
28	-	-	42,0	19,0

Spermatozoen

(ngCalmodulin/ 10^6 Sperm.)

Seminalplasma

(ngCalmodulin/100 μ l)

Ejakulat-Nr.	RIA	ELISA	RIA	ELISA
29	9,7	0,6	28,0	17,0
30	0,3	0,8	20,0	15,0
31	(17,9)	(40,0)	44,0	48,0
32	1,0	0,2	(80,0)	28,0
33	1,1	9,4	15,2	28,0
34	5,1	9,0	26,0	20,0
35	1,4	6,6	(80,0)	17,0
36	-	-	32,0	29,0
37	12,2	1,0	32,0	32,0
38	0,3	0,1	40,2	29,0
39	0,6	1,6	16,8	15,0
40	0,6	1,6	38,0	42,0
41	0,3	0,3	28,8	25,0
42	0,9	1,2	24,8	18,0
43	0,5	0,3	24,8	18,0
44	2,3	0,7	34,4	33,0
45	(31,3)	(54,4)	41,6	(215,0)
46	0,6	1,7	46,4	-
47	2,2	6,4	24,8	42,0
48	0,8	1,1	25,6	32,0
49	13,5	0,9	22,4	17,0
50	4,1	5,7	30,4	24,0
51	0,5	0,6	20,8	(254,0)
52	2,5	2,6	21,6	(191,0)
53	1,2	5,5	16,8	10,0
54	1,1	3,5	46,4	20,0
55	0,9	3,2	36,0	32,0
56	1,4	2,0	46,4	44,0
57	0,9	0,8	23,2	(167,0)
58	3,2	0,6	44,8	-

Ejakulat-Nr.	<u>Spermatozoen</u> (ngCalmodulin/10 ⁶ Sperm.)		<u>Seminalplasma</u> (ngCalmodulin/100µl)	
	RIA	ELISA	RIA	ELISA
59	5,7	2,5	49,6	55,0
60	0,8	0,7	35,2	62,0
61	5,0	5,2	28,8	23,0
62	0,4	1,8	56,0	16,0
63	3,1	1,3	41,6	35,0
64	3,7	5,2	36,0	-
65	-	-	33,6	26,0
66	0,1	0,1	25,2	22,0
67	-	-	51,2	32,0
68	1,0	0,8	23,2	39,0
69	2,1	3,2	31,2	20,0
70	0,9	1,2	20,0	-
71	5,7	7,1	46,4	32,0
72	0,3	0,5	38,4	16,0
73	0,3	0,3	46,4	33,0
74	0,5	0,5	18,4	11,0
75	0,5	0,4	20,0	65,0
76	0,2	0,3	28,8	-
77	0,5	0,5	23,2	(149,0)
78	7,5	3,9	23,2	49,0
79	-	-	28,8	(138,0)
80	1,3	1,6	56,0	(180,0)
Mittelwert $\bar{x}$ (ng/10 ⁶ Spermatozoen):				
	2,26	2,39	30,38	27,22
Standardabweichung s:				
	2,83	2,41	11,36	12,38

Die erhaltenen Meßwerte wurden einer statistischen Prüfung unterzogen. Neben den bereits in der Tabelle V.1. angegebenen Mittelwerten und Standardabweichungen wurde der t-Test für verbundene Stichproben bei zweiseitiger Fragestellung durchgeführt.

Vergleich der Spermatozoenfraktionen (RIA, ELISA):

Errechneter t-Wert : 0,352

Freiheitsgrade: : 67

Signifikanzniveau α : 0,05

t_f -Wert (Tabelle) : 1,67

Der errechnete t-Wert ist kleiner als der aus der Tabelle entnommene. Nach der Entscheidungsregel für diesen t-Test muß daher die Nullhypothese aufrechterhalten werden. Das heißt, es ergibt sich kein statistischer Unterschied zwischen den Meßwerten der Spermatozoenfraktionen in RIA und ELISA (mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$). Dies wird durch die Errechnung des Korrelationskoeffizienten (im Vergleich der Ränge) unterstrichen, der für die beiden Meßreihen RIA und ELISA (Spermatozoenfraktion) 0,6 beträgt.

Der oben genannte t-Test wurde ebenfalls zur Überprüfung der beiden Meßreihen "Seminalplasma" (RIA und ELISA) eingesetzt:

Vergleich der Seminalplasmafraktionen (RIA und ELISA):

Errechneter t-Wert : 1,63

Freiheitsgrade : 60

Signifikanzniveau α : 0,05

t_f -Wert (Tabelle) : 1,67

Auch hier ist der errechnete t-Wert kleiner als der t_f -Wert der Tabelle. Die Nullhypothese kann somit auch in diesem Fall nicht verworfen werden. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 läßt sich also kein statistischer Unterschied zwischen den gemessenen RIA und ELISA-Werten der Seminalplasmafraktionen

feststellen. Der Korrelationskoeffizient (im Vergleich der Ränge) beträgt auch in diesem Fall 0,6. Die Parallelbestimmung von Calmodulin in RIA und ELISA erbrachte also eine weitgehende Übereinstimmung. Damit war nicht nur eine Kontrolle der in einem Meßverfahren gewonnenen Werte gegeben. Die relativ neue Methode des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay stellt demnach eine hochempfindliche, zuverlässige Methode dar, die für die Zukunft gesehen in der Lage sein könnte, den RIA zu ersetzen. Dies hätte nicht nur im Hinblick auf eine einfachere Durchführung und den geringeren labortechnischen Aufwand des ELISA bedeutende Vorteile; die im RIA verwendeten radioaktiven Stoffe stellen eine Belastung für die Umwelt dar, die beim Meßverfahren des ELISA nicht auftritt. Somit wäre eine "Ablösung" des RIA durch den ELISA wünschenswert und von Vorteil.

Anschließend an die Messung sollte gezeigt werden, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen den gemessenen Calmodulin-Werten der Spermatozoenfraktion bzw. des Seminalplasmas und der Zahl, der Morphologie und der Motilität der Spermatozoen besteht. Dazu teilte man die Ejakulate auf in die Gruppen Terato-, Astheno-, Oligo-, Poly- und Kryptozoospermie (s. Tabelle VI.1.) und setzte diese Gruppe mittels des (ungepaarten) Student-Testes in Zusammenhang mit den gemessenen Calmodulin-Werten. Dabei ließ sich allerdings keinerlei Korrelation feststellen.

V.2.2. Gehalt an Calmodulin und Seminalplasmen aus menschlichen Splitejakulaten

Außerdem wurde der Calmodulin-Gehalt im Seminalplasma von Splitejakulaten bestimmt. Beim Splitejakulat, einem in zwei Portionen gesammelten Ejakulat, befinden sich in der ersten Hälfte etwa $2/3$ aller Spermatozoen. Die progressive Motilität der Spermatozoen ist in der ersten Fraktion des Splitejakulates besser als im gesamten Ejakulat.

Es wurde geprüft, ob in den Fraktionen I oder II der Ejakulate ein wesentlich höherer Teil der Calmodulin-Menge, verglichen mit der jeweils verbleibenden Fraktion, vorhanden ist. Dazu trennte man die Spermatozoenfraktion ab und verwendete ausschließlich das Seminalplasma. Es ließ sich aber kein signifikanter Unterschied im Calmodulin-Gehalt der beiden Fraktionsgruppen beobachten; die gemessenen Calmodulin-Werte im Seminalplasma der Splitejakulate wiesen jedoch beinahe die doppelte Menge an Calmodulin, verglichen mit den Seminalplasmen aus "normalen" Gesamtejakulaten auf. (Einzelne Werte siehe Tabelle V.2). Ob diese höheren Konzentrationen an Calmodulin im Splitejakulat in Zusammenhang mit der günstigeren Motilität der Spermatozoen gebracht werden kann, ist ungewiß (siehe Diskussion, VI.6.).

Tabelle V.2.

<u>Splitejakulate</u>	<u>FraktionI</u>	<u>FraktionII</u>
	ng Calmodulin/100 μ l	
1	46,8	56,0
2	43,6	38,4
3	65,2	52,0
4	64,0	44,0
5	80,0	68,0
Mittelwert $\bar{x}$:	59,9	43,9
Standardabwg.:	14,9	21,6

V.2.3. Gehalt an Calmodulin in Prostasomenfraktionen aus menschlichem Seminalplasma

Aus Seminalplasma lässt sich eine Membranvesikelfraktion isolieren, die mit großer Wahrscheinlichkeit aus der Prostata stammt. Diese Membranvesikel, Prostasomen genannt, weisen in vitro einen positiven Einfluß auf die Motilität gewaschener Spermatozoen auf (KRASSNIGG et al. - 1983). Es wurden aus vier Seminalplasmen die Prostasomenfraktionen abgetrennt und zunächst der Gesamtproteingehalt der Proben bestimmt, der sich auf 5mg/ml ermitteln ließ. Danach wurde im RIA die Menge an Calmodulin und Calmodulin-ähnlichen Proteinen gemessen, wobei sich folgende Werte ergaben:

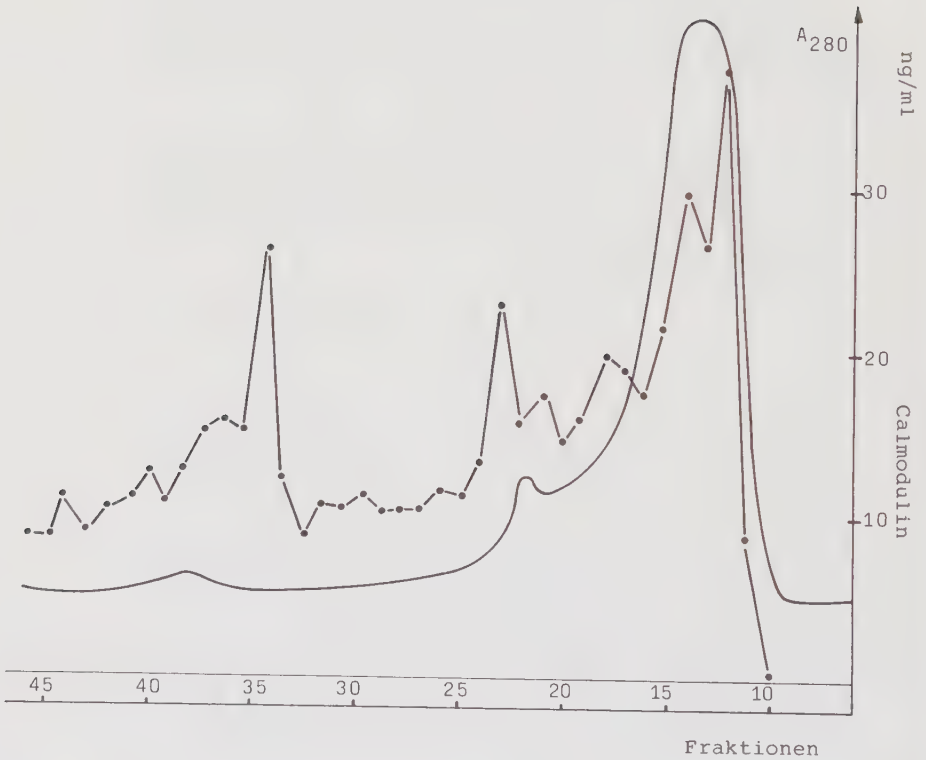
6,48ng Calmodulin/100 μ l	
6,32ng	"
6,80ng	"
7,20ng	"

was ungefähr dem vierten Teil der Calmodulin-Menge eines Seminalplasmas entspricht.

Anknüpfend an diese Ergebnisse wurden die Membranvesikelfraktionen gelchromatographisch aufgetrennt. Die Verteilung von Calmodulin aus humanem Seminalplasma nach Chromatographie zeigt Kurve V.5. Zu Beginn der

Auftrennung läßt sich ein deutlicher Calmodulin-Peak verzeichnen, im weiteren Verlauf sind noch zwei Peaks zu beobachten, wobei die größere Menge an Calmodulin im zweiten Peak gegen Ende der chromatographischen Auftrennung zu finden ist. Diesem Ergebnis dürfte wohl eine Dimerisierung des Proteins zugrunde liegen.

Ein gewisser Prozentsatz der im Seminalplasma zu findenden Calmodulin-Menge ist demnach in den Prostatosomen lokalisiert, und stellt eine wichtige Komponente dieser Membranvesikel dar.



Kurve V. 5.

Gelchromatographie der Membranvesikel (Prostasomen)
- Elutionsdiagramm; -.- Calmodulin gemessen bei 492
nm im ELISA in ng/ml

V.2.4. Gehalt an Calmodulin im Serum

Abschließend interessierte der Calmodulin-Gehalt in einer dem Seminalplasma in Zusammensetzung verwandten Körperflüssigkeit, dem Serum.

Es wurden Seren von 10 Normalpersonen gewonnen und diese Proben im RIA eingesetzt. Dabei fanden sich im Mittel 5,2ng Calmodulin/100 μ l Probe, was dem fünften bis sechsten Teil der Menge an Calmodulin entspricht, die sich im Seminalplasma ermitteln ließ. Als Vergleich zu Seren von Normalpersonen bestimmte man im RIA Calmodulin in den Seren von 10 polytraumatisierten Patienten. Es ergab sich ein Mittelwert von 2,98 ng Calmodulin/100 μ l Serum. (Werte im einzelnen siehe Tabelle V.3. und V.4.). Die Menge an Calmodulin im Serum von polytraumatisierten Patienten liegt also ca. 2ng unter den gemessenen Calmodulin-Werten von "Normal"-Seren. Die Behauptung, daß sich die beiden Gruppen in ihrem Calmodulin-Gehalt unterscheiden, bestätigte sich bei der statistischen Auswertung der Meßdaten, der beiden Serumgruppen Normalpersonen - Polytrauma. Verwendet wurde der t-Test für unverbundene Stichproben bei zweiseitiger Fragestellung.

Errechneter t-Wert:	2,689
Freiheitsgrade:	8
Signifikanzniveau:	0,05
t_f -Wert (Tabelle):	1,86

Die Testentscheidung für diesen Test bei zweiseitiger Fragestellung lautet: Die Nullhypothese muß verworfen werden, falls der errechnete t-Wert größer als der entsprechende t_f -Wert der Tabelle ist. Dies ist in vorliegendem Fall gegeben, das heißt, es besteht eine statistische Differenz zwischen den beiden Meßreihen Calmodulin in Normalseren bzw. Calmodulin in Seren von polytraumatisierten Patienten. Da über die Bedeutung von Calmodulin im Serum noch keinerlei Erkenntnisse vorliegen, lassen sich außer den hier erstmals

vorgelegten Mengenangaben und der statistischen Untermauerung keine weiteren Aussagen treffen. Ob Calmodulin - wenigstens zum Teil - aus dem Blutserum stammt, die Blut-Seminalplasma-Schranke passieren kann und somit im Seminalplasma erscheint, oder ob Calmodulin ausschließlich aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen stammt, ist noch unbekannt.

Tabelle V.3.

Serum, Normalpersonen	ng Calmodulin/100 μ l Serum
1	5,2
2	5,0
3	3,8
4	5,8
5	1,8
6	4,6
7	8,0
8	7,2
9	5,6
10	5,0
Mittelwert: $\bar{x}$ =	5,2
Standardabwg.: s =	1,7

Tabelle V.4.

Serum, Polytraumen	ng Calmodulin/100 μ l Serum
1	1,4
2	2,3
3	2,7
4	2,5
5	2,9
6	2,6
7	2,3
8	8,0
9	(16,4)
10	2,1
Mittelwert: $\bar{x}$ =	2,98
Standardabwg.: s =	1,9

V.3. Lokalisation von Calmodulin in humanen Spermatozoen

Nachdem die Menge an Calmodulin in den verschiedenen Proben gemessen worden war, sollte die Lokalisation des Proteins in humanen Spermatozoen bestimmt werden. Wie bereits erwähnt, findet sich Calmodulin im Säugtierspermatozoon an vier verschiedenen Stellen; rund um das Akrosom, streifenförmig über dem unteren Drittel des Kopfes, am Ansatzstück und an der Spitze des Schwanzes.

Die Bestimmung wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu verwendete man gewaschene menschliche Spermatozoen; als erster Antikörper diente die IgG-Fraktion des Kaninchen-Antiserums, als zweiter Antikörper Anti-Kaninchen-IgG der Firma Boehringer. Als Kontrolle wurde PBS-Puffer (als erster Antikörper) eingesetzt, des weiteren normales Kaninchen-Serum in einer Verdünnung von 1:100.

In den Aufnahmen zeigte sich, im Gegensatz zu den Kontrollaufnahmen, ein Fluoreszenzstreifen jeweils am Akrosom, am Äquatorialssegment und am Ansatzstück des Schwanzes.

Somit wurde ein fast identisches Ergebnis erzielt, wie es JONES et al. (1980) veröffentlichten, die das Calmodulinverteilungsmuster an Kaninchen- und Meer-schweinchenspermatozoen bestimmten, vergleicht man die Untersuchungen an Spermatozoen mit noch nicht abgelaufener Akrosomreaktion.

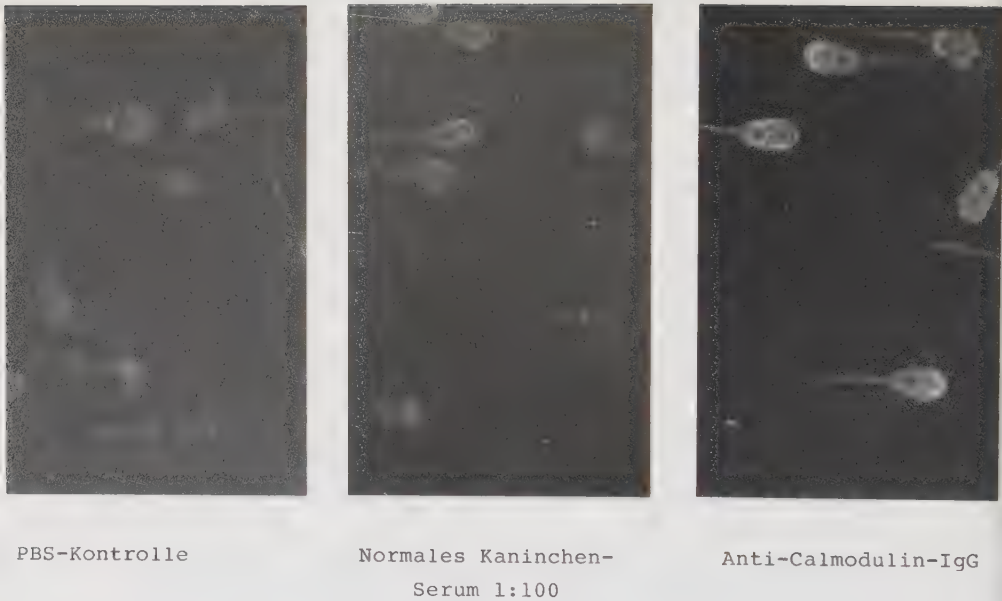


Abb. V. 1.

Lokalisierung von Calmodulin durch indirekte Immun-
fluoreszenz an menschlichen Spermatozoen.

V.4. Extraktion von Calmodulin aus menschlichem Seminalplasma

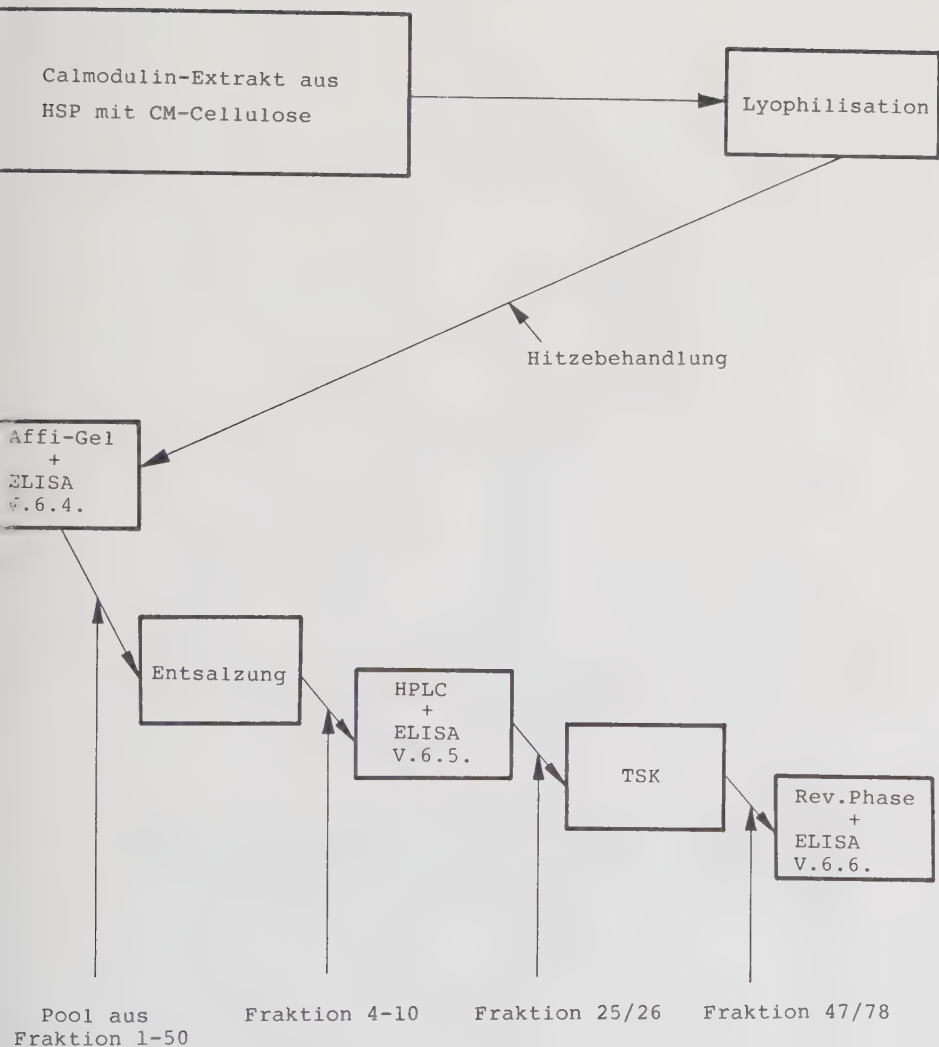
Nachdem die Quantität an Calmodulin in den verschiedenen Fraktionen des menschlichen Ejakulates und die Lokalisation dieses Proteins im menschlichen Spermatozoon bestimmt waren, sollte versucht werden, Calmodulin aus humanem Seminalplasma zu isolieren.

Mit der Methode der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie, im Englischen High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC), wurde ein hochauflösendes, zuverlässiges Verfahren gewählt. Neben der klassischen Säulenchromatographie fand ein Reversed-Phase-System Anwendung, bei welchem im Gegensatz zu den herkömmlichen Chromatographiesystemen, die stationäre Phase unpolar ist, die mobile Phase dementsprechend polar. Solche Systeme werden bevorzugt dann verwendet, wenn Stoffe getrennt werden sollen, die nur in sehr polaren Eluenten gelöst werden können und an den üblichen polaren Sorbenzien nicht mehr zurückgehalten werden. Calmodulin kann aufgrund seiner Hydrophobizität mit dieser Chromatographie, deren stationäre Phase eine hydrophobe Oberfläche besitzt, gut abgetrennt werden (GUERINI et al. - 1985).

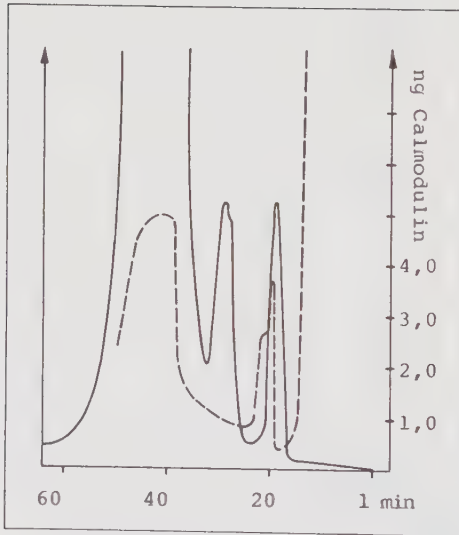
Das Ausgangsmaterial bestand aus einem Pool von 30 Seminalplasmen, der über eine CM-Cellulose-Säule gegeben wurde.

Das Calmodulin-enthaltende Eluat wurde zunächst lyophilisiert und anschließend durch hochauflösende Gel-filtration weiter fraktioniert. Aus allen gewonnenen Fraktionen aller Säulenextraktionen wurden ELISAs angefertigt, um mit dieser empfindlichen Methode die Ergebnisse der Chromatographien überprüfen zu können. Um das erhaltene Ergebnis (s. Kurve V.6.1) zu ver-

bessern, die "störenden", im Gegensatz zu Calmodulin nicht hitzebeständigen Proteine, auszuschalten, wurde das Ausgangsmaterial, der Pool der CM-Cellulose-Säule 5min bei 95°C erhitzt. Anschließend schickte man die so behandelte Probe über eine HPLC-Säule und erstellte wieder einen ELISA (s. Kurve V.6.2.). Um einen höheren Grad der Reinheit zu erzielen, wurde der hitzebehandelte Pool 24 Stunden gegen Wasser dialysiert und wiederum einer Chromatographie und einem ELISA unterzogen (s. Kurve V.6.3.).

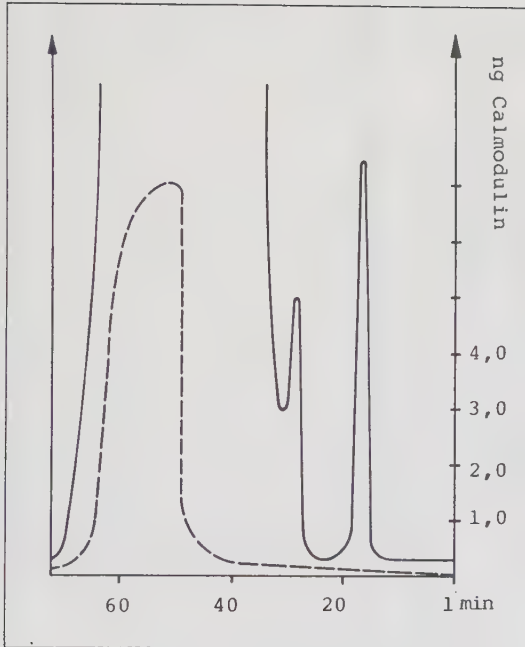


Schema der Calmodulin-Extraktion aus Seminalplasma



Kurve V. 6.1.

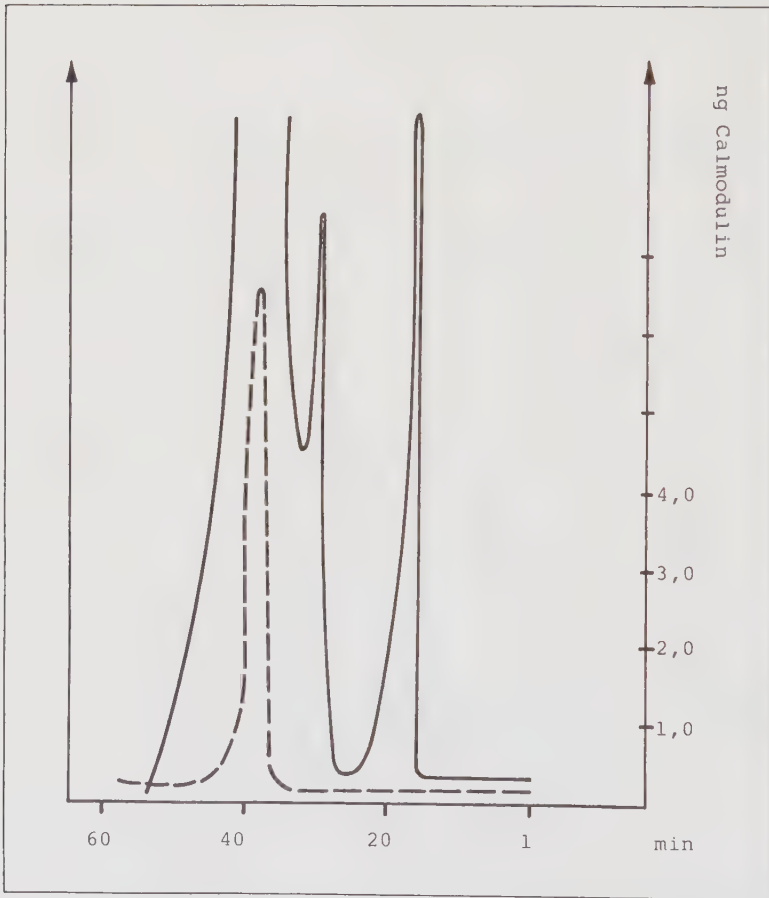
Hochauflösende Gelfiltration des Pool I der CM-Cel-
lulose-Säule. - 275 nm; --- ELISA der erhaltenen
Fraktionen



Kurve V. 6.2.

Hochauflösende Gelfiltration des Calmodulin-Pools der
CM-Cellulose-Säule nach Hitzebehandlung. - 275nm;

--- ELISA der erhaltenen Fraktionen

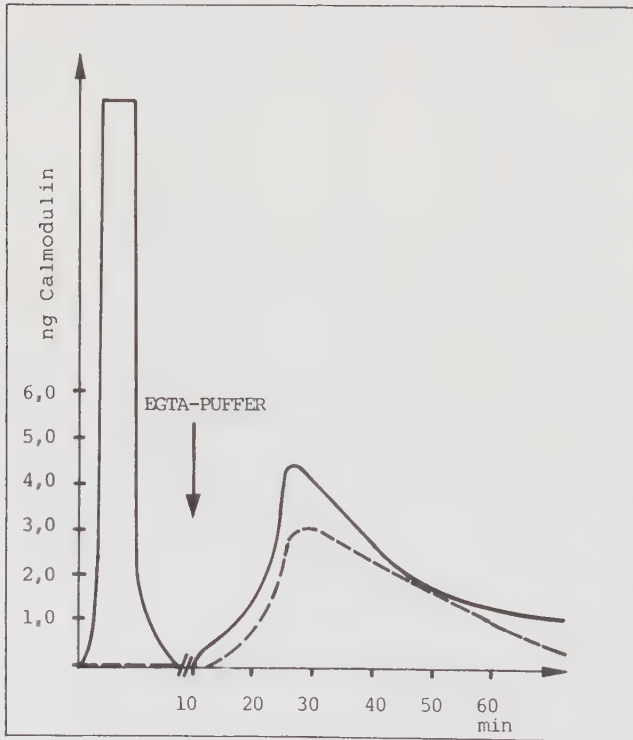


Kurve V. 6.3.

Hochauflösende Gelfiltration des Calmodulin-Pools der
CM-Cellulose-Säule nach Hitzebehandlung und Dialyse;
- 275 nm; --- ELISA der erhaltenen Fraktionen

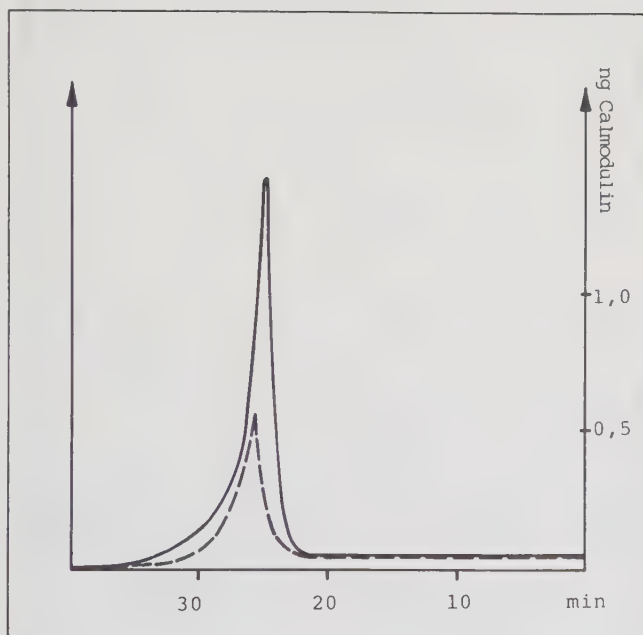
Da aber durch diese Maßnahmen keine zufriedenstellende Isolierung des Calmodulin gelang, wurde das zu Beginn hergestellte Lyophilisat auf eine Affi-Gel^R -Phe-nothiazin-Säule (BioRad, München) aufgetragen. Wie in den oben beschriebenen drei Reinigungsschritten, wurde auch hier das Lyophilisat vor Auftragen auf die Säule mit Applikationspuffer gewaschen und anschließend Calmodulin mit EGTA-Puffer eluiert (s. Kurve V.6.4.).

Danach sammelte man die Fraktionen 1-50 und führte sie der Entsalzung auf einer PD10-Säule mit Ammoniumacetat zu. Die dadurch erhaltenen, Calmodulin enthaltenden Fraktionen 4-10 wurden über eine HPLC-Säule mit anschließendem ELISA geschickt (s. Kurve V.6.5.). Die entsprechenden Fraktionen (25,26) wurden erneut einer Reinigung auf einer HPLC-Säule (TSK) unterzogen und man erhielt, nach Auftragen der aus der letzten Extraktion gewonnenen Calmodulin-Fraktionen 47/48 auf eine Reversed-Phase-Säule, oben genannte Adsorptionschromatographie, eine ausreichend reine Darstellung des Calmodulin (s. Kurve V.6.6.). Das Ergebnis wurde auch hier im ELISA bestätigt.



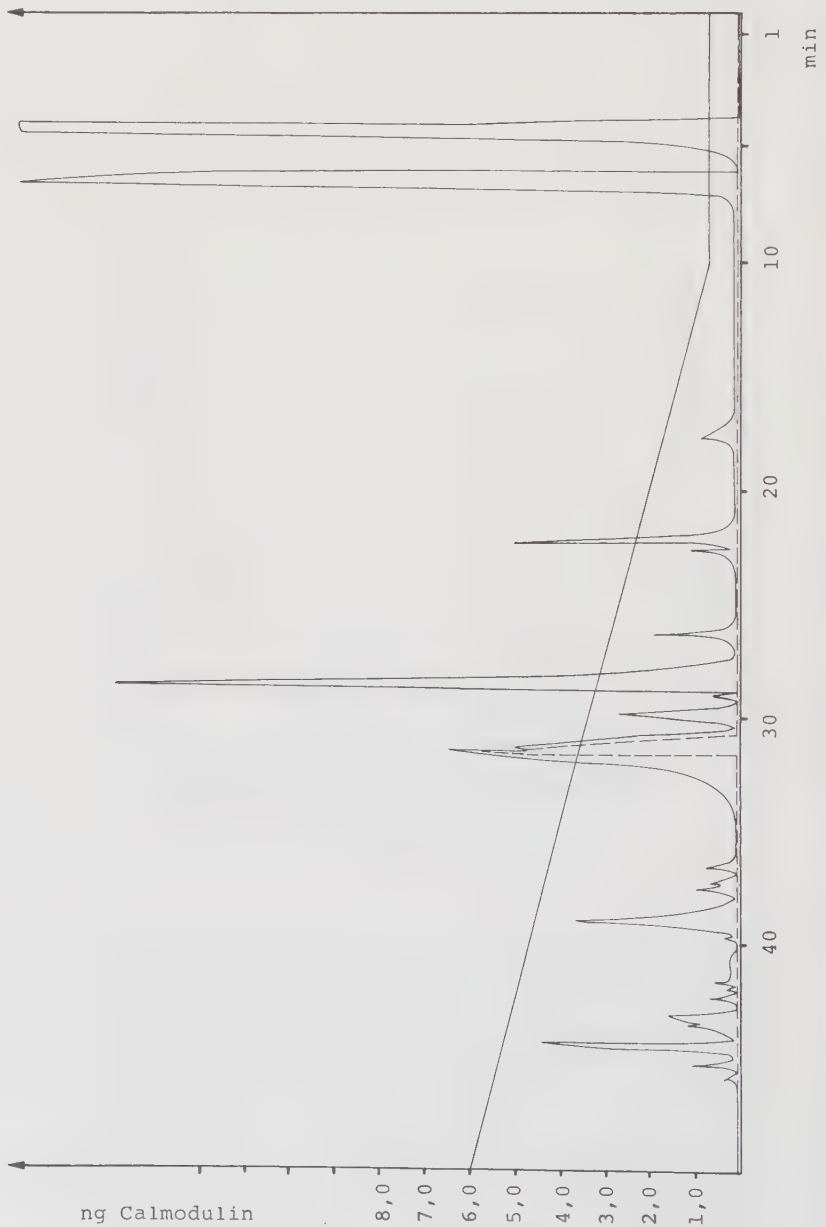
Kurve V.6.4.

Affi-Gel^R-Phenothiazin-Säule. Aufgetragen wurde der Pool I der CM-Cellulose-Säule nach Lyophilisation und Hitzebehandlung. - 280 nm; --- ELISA der erhaltenen Fraktionen



Kurve V.6.5.

Hochauflösende Gelfiltration der Fraktionen 4-10
der Entsalzung. - 275 nm; --- ELISA der erhal-
tenen Fraktionen.



Kurve V.6.6.
Reversed-Phase; aufgetragen Fraktion 47/48 der TSK-
Säule. - 218 nm; --- ELISA der erhaltenen Fraktionen

VI. DISKUSSION

Wie in Teil III geschildert, läßt sich Calmodulin sowohl im menschlichen Spermatozoon als auch im Seminalplasma aus humanem Ejakulat nachweisen. Betrachtet man die Ergebnisse hinsichtlich des Verteilungsmusters von Calmodulin im Spermatozoon - am Akrosom, am Äquatoralsegment und am Ansatzstück des Schwanzes - läßt sich vermuten, daß Calmodulin in verschiedenen Vorgängen im Spermatozoon beteiligt sei, wie z.B. Kapazitation, Akrosomreaktion, Motilität etc.

VI.1. Mögliche Beteiligung von Calmodulin an Kapazitation und Akrosomreaktion

Das Akrosom, ein Derivat des Golgiapparates, stülpt sich unterhalb der Plasmamembran wie eine Kappe über die vordere Hälfte des Spermatozoennukleus (s. Abb. III.3.). Es besteht aus einer Matrix, welche von zwei Membranen begrenzt wird, der äußeren akrosomalen Membran, die an die Plasmamembran grenzt, und der inneren akrosomalen Membran. Diese verläuft entlang der Nukleushülle, mit Ausnahme im Bereich des Subakrosoms. Die akrosomalen Membranen unterscheiden sich in Struktur und physio-chemischen Eigenschaften, wobei die äußere Membran brüchiger, leichter abzutrennen und zu spalten ist. Abgesehen von Hyaluronidase und Proteinasen enthält das Akrosom typische lysosomale Enzyme, wie Neuraminidase, Phospholipase, Aryl-Sulphatase, β -N-Acetyl-Glucosaminidase, Phospholipase A u.a., und wird als eine hochentwickelte Form eines Lysosoms angesehen. Die akrosomalen Enzyme, so wird heute angenommen, sind an der Penetration des Spermatozoons durch die Eihülle beim Säugetier beteiligt.

Der Akrosomreaktion geht die sogenannte Kapazitation voraus, ein Vorgang, für welchen bis heute keine definierten strukturellen oder chemischen Veränderungen innerhalb des Spermatozoons nachzuweisen sind. Nur die Plasmamembran zeigt eine erhöhte Permeabilität für Metallionen.

Eine Reihe von Untersuchungen bestätigen die Annahme, es handle sich bei der Kapazitation um einen Reifungsprozeß des Spermatozoons, der nach der Ejakulation im weiblichen Genitaltrakt stattfindet und Voraussetzung der nachfolgenden Akrosomreaktion ist. Diese wird eingeleitet durch die Fusion der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran an vielen verschiedenen Punkten. Daraus resultiert eine Reihe von kleinen Vesikeln, die über die Akrosomenmatrix verteilt liegen. Die innere akrosomale Membran wird freigelegt und wird nun zur äußeren Membran des Spermatozoenkopfes (s. Abb. VI.1.).

Bei diesem Vorgang werden die akrosomalen Enzyme freigelegt. Über die Bedeutung dieses zur Befruchtung notwendigen Prozesses hinsichtlich der sich anschließenden Vorgänge - Durchdringen der Zona pellucida und Verschmelzung von Spermatozoon und Ei - liegen noch keine genauen Kenntnisse vor.

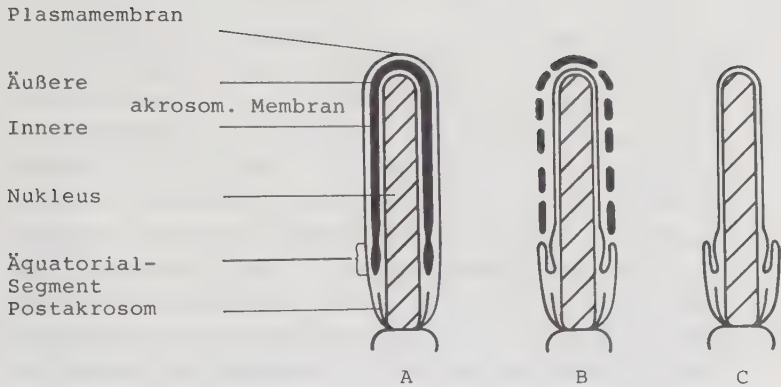


Abb. VI.1. Schematische Darstellung der Akrosomreaktion

- A) Spermatozoonkopf vor Einsetzen der Akrosomreaktion
- B) Nach Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran
- C) Spermatozoonkopf nach Beendigung der Akrosomreaktion

Es ist jedoch bekannt, daß die Akrosomreaktion von einer Reihe von Ionenverschiebungen eingeleitet wird, wie Depolarisation des Membranpotentials, intrazelluläre Alkalisierung, Na^+ -Aufnahme, K^+ -Ausstrom und Calcium-Einstrom. Die Akrosomreaktion kann ebenso von bestimmten Ionophoren, wie Nigericin oder A23187, induziert werden und wird von Stoffen, welche den Calcium-Ein- und Ausstrom beeinflussen, sowie von K^+ -Blockern, gehemmt (KAZAZOGLU et al. -1985). Für die Vesikelbildung wird extrazelluläres Calcium benötigt; außerdem ist bekannt, daß Stoffe, welche den Calcium-Einstrom erhöhen, gleichzeitig die Rate der Akrosomreaktionen erhöhen (SINGH et al.- 1978). Ein Großteil des in das Spermatozoon aufgenommene Calcium lagert sich in den Mitochondrien ein. Die Permeabilität der Spermatozoen-Plasmamembran für Calcium ist vor Beginn der Akrosomreaktion gering, wogegen sie während der Akrosomreaktion und der sie vorbereitenden Ionenverschiebung enorm ansteigt. Interessanterweise läßt sich die Akrosomreaktion neben einer Reihe von Calcium-Antagonisten auch durch Trifluoperazin, einem Calmodulin-Inhibitor, hemmen (aus KAZAZOGLU et al. - 1985). Möglicherweise wird während der Calcium-Aufnahme ein Calcium-Calmodulin-Komplex gebildet, welcher strukturelle und funktionelle Änderungen wie z. B. die Vesikulation initiiert.

Wie gezeigt werden konnte, ist Calmodulin am Spermatozoenkopf, rund um das Akrosom und am Äquatorialsegment lokalisiert. JONES und Mitarbeiter (1980) wiesen Calmodulin nach Ablauf der Akrosomreaktion in den freien, abgetrennten Akrosomenkappen nach, bei ansonsten unverändertem Verteilungsmuster im übrigen Spermatozoon. Aufgrund dieser Ergebnisse lassen sich einige mögliche Funktionen von Calmodulin diskutieren und Spekulationen über die genaue Lokalisation dieses Proteins im Spermatozoon anstellen.

Zunächst weisen eben genannte Ergebnisse darauf hin, daß Calmodulin in der äußeren akrosomalen Membran lokalisiert ist: Calmodulin ließ sich zwar durch Immunfluoreszenz in den abgelösten akrosomalen Membranstücken nachweisen, wenn auch mit abgeschwächter Fluoreszenz. Niemals war jedoch nach abgelaufener Akrosomreaktion Calmodulin-Fluoreszenz in der inneren akrosomalen Membran zu beobachten. Calmodulin könnte aber auch in der akrosomalen Matrix vorhanden sein. Eine andere Hypothese wäre, daß Calmodulin in Spermatozoen mit noch nicht abgelaufener Akrosomreaktion in seiner inaktiven Form im Zytoplasma, zwischen der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran lokalisiert ist. Während des der Akrosomreaktion unmittelbar vorangehenden Calcium-Einstromes könnte sich Calcium mit Calmodulin verbinden und ein Teil des Calcium-Calmodulin-Komplexes wäre dann in der Lage, mit Plasmabestandteilen oder mit der äußeren akrosomalen Membran zu reagieren. Letzteres wäre eine mögliche Triggerung der Akrosomreaktion. Bei der Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran bleibt ein schmaler Streifen von beiden Membranen am unteren Ende des Akrosoms intakt. Diese Membranabschnitte sind mit dem im Ergebnisteil beschriebenen Fluoreszenzstreifen am unteren Drittel des Spermatozoonkopfes mit großer Wahrscheinlichkeit identisch. Bis heute wird angenommen, daß dieses von den Membranresten umschlossene Äquatorialesegment eine bedeutende Rolle beim Vorgang der Penetration des Spermatozoons in das Ei inne hat. Dieser Prozeß, so wird vermutet, nimmt vom Äquatorialesegment oder von benachbarten Zonen seinen Ausgang. Wie bereits erwähnt, ist Calcium in die Vorgänge der Spermatozoen-Ei-Fusion involviert. Da Calmodulin in den Strukturen, die mit dem Fusionsvorgang wahrscheinlich in Zusammenhang stehen vorkommt, läßt sich für Calmodulin

eine Funktion bei den Vorgängen dieser Zellfusion annehmen.

VI.2. Calmodulin und Motilität der Spermatozoen

Eine weitere Lokalisation von Calmodulin zeigte sich am Ansatz des Spermatozoenschwanzes. Dieser Ansatz umfaßt das Hals- und Mittelstück, in welchen die Axone beginnen und die Mitochondrien eingelagert sind (s. Abb. III.3.). Letztere liefern die Energie für den an meisten energieverbrauchenden Prozeß des lebenden Spermatozoons: seine Motilität mittels Schwanzbewegungen. Diese zur Befruchtung notwendige Eigenschaft wird erst während der Passage durch den Nebenhoden von den Spermatozoen erworben. Das Hauptstück des Spermatozoenschwanzes besteht aus einem axialen Filamentkomplex, der von neun Mantelfibrillen und der Plasmamembran umgeben wird. Dieser Filamentkomplex enthält neun Paare von Axonemen, d.h. neun Mikrotubulipaare, die ein zentrales Fibrillenpaar zylindrisch umgeben (s. Abb. VI.2.). Ähnlich der für die Muskelbewegung verantwortlichen Proteine Aktin und Myosin, sind für die Schwanzbewegung zwei Proteine, Tubulin und Dynein, in den axonemalen Mikrotubuli vorhanden. Dynein stellt das Hauptprotein in den "Armen" der Mikrotubuli dar und besitzt eine spezifische ATPase-Aktivität. Die Mikrotubulipaare selbst bestehen hauptsächlich aus Tubulin.

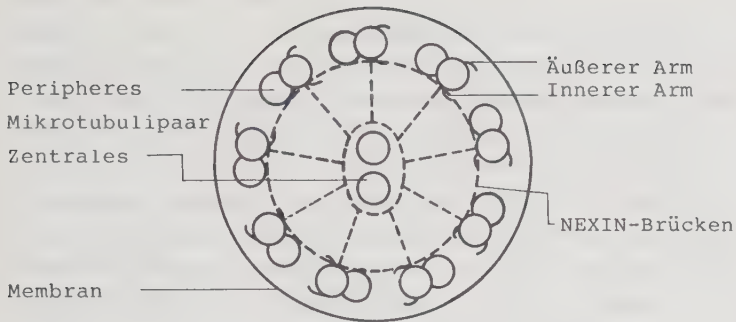


Abb. VI.2. Schematischer Querschnitt eines Axialen Filamentkomplexes

Es wird heute angenommen, daß der Bewegungsprozeß durch Gleiten der neun Mikrotubulipaare aneinander zustandekommt, was durch die ATP enthaltenden Dynein-Arme bewerkstelligt wird. Die Geschwindigkeit, mit welcher die Filamente aneinander gleiten, hängt von der vorhandenen Anzahl der Dynein-Arme ab.

Die Motilität stellt einen energieverbrauchenden Vorgang dar, wobei die Energie aus der Dephosphorylierung von ATP zu ADP stammt, also chemische Energie in mechanische Energie umgesetzt wird. Das benötigte ATP wird von den Mitochondrien des Mittelstückes geliefert, wobei ATP durch Diffusion entlang des Schwanzes an den Bestimmungsort gelangt.

Diese Vorgänge können jedoch nur bei einer bestimmten intrazellulären Calciumkonzentration ablaufen, welche durch eine Calcium-Pumpe und ein Na/Ca-Antiportsystem aufrechterhalten wird (s. III.5.). Da nun Calmodulin am Anfang und zum Teil auch am Ende des Axon-Komplexes beobachtet wurde, wäre ein Mitwirken von Calmodulin an den Bewegungen der axonemalen Mikrotubuli möglich, vor allem seit bekannt ist, daß Calmodulin in

vitro die Calcium-induzierte Depolymerisation von Mikrotubuli reguliert (MARCUM et al. - 1978). Auch könnte Calmodulin die Dynein-ATPase-Aktivität über den Dephosphorylierungsprozeß beeinflussen, da Calmodulin als Aktivator der Protein-Phosphorylierung gilt.

Über die Rolle von Calmodulin am Ende des Hauptstückes (des Spermatozoenschwanzes) sind bislang nur vage Aussagen möglich; eventuell hängt sie mit der Tatsache zusammen, daß das zentrale Mikrotubulipaar in bestimmte Strukturen der Plasmamembran an der Schwanzspitze einmündet.

Diese Überlegungen werden durch die Entdeckungen BROKAS's und Mitarbeiter (1985) unterstützt, die zeigen, daß eine symmetrische, vorwärtsgerichtete Bewegung des Spermatozoenschwanzes der Seeigel von der An- bzw. Abwesenheit axonemalen Calmodulins abhängt und Calmodulin offenbar den Calcium-Effekt - konzentrationsabhängig von Stillstand bis zu optimaler Motilität reichend - reguliert.

VI.3. Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit der Ejakulate und dem Calmodulin-Gehalt

Die bisherigen Untersuchungen galten dem einzelnen, intakten Spermatozoon. Um einen vielleicht bestehenden Zusammenhang zwischen der Spermatozoenzahl eines Ejakulates, der Morphologie und der Motilität der Spermatozoen, und der gemessenen Calmodulinmenge ausfindig zu machen, wurden, wie im Ergebnisteil beschrieben, die Ejakulate in folgende Gruppen aufgeteilt:

Tabelle VI.1.

	<u>Sperm.Zahl</u>	<u>Morphologie</u>	<u>Motilität</u>
Normozoospermie	≥ 20Mill/ml	≥ 50% normal	≥ 50% bewegl.
Asthenozoospermie	≥ 20Mill/ml	≥ 50% normal	< 50% bewegl.
Oligozoospermie	< 20Mill/ml	< 50% normal	< 50% bewegl.
Teratozoospermie	> 20Mill/ml	< 50% normal	< 50% bewegl.
Polyzoospermie	> 250Mill/ml		
Kryptozoospermie	< 1Mill/ml		
Azoospermie	keine Sperm.		

Bis heute sind keine Erkenntnisse über die Calmodulin-Menge, eine evtl. unterschiedliche Calmodulin-Lokalisation im Spermatozoon etc. bei den verschiedenen von der Norm abweichenden Ejakulatbefunden bekannt. Es kann lediglich die Aussage getroffen werden, daß weder eine signifikante Änderung im Calmodulin-Gehalt des Seminalplasmas noch der Spermatozoen bei oben aufgeführten Ejakulatgruppen zu verzeichnen ist.

VI.4. Calmodulin im Seminalplasma

Der Hauptteil von Calmodulin im Ejakulat fand sich im Seminalplasma. Dieses weist eine interessante Zusammensetzung auf, die man eher Pflanzen oder Mikroorganismen als tierischen Körperflüssigkeiten zuordnen würde: Zitronensäure, Prostaglandin, Fructose, Phosphorylcholin, Ergothionin, Inositol, Glycerylphosphorylcholin, Sorbitol, Carnitin und Acetylcarnitin, Hypotaurin, Scyllitol und N-Acetylglucosamin. Außerdem ist das Seminalplasma reich an freien Aminosäuren, besonders an Glutamin, und enthält eine Vielzahl an Enzymen: Nukleolytische Enzyme, proteolytische Enzyme, eine Reihe Phosphatasen und eine große Anzahl Glykosidasen. Daneben sind Proteine vorhanden, die zum Teil aus dem Serum stammen.

Der Hauptteil des Seminalplasmas wird von den Bläschendrüssen und der Prostata sezerniert, außerdem finden sich Sekrete aus Hoden und Nebenhoden, Ductus deferens, Ampulle, Bulbourethraldrüsen und Urethraldrüsen. Insgesamt ergibt sich ein Volumen von 2-6ml, bei einem pH-Wert von 7,0-7,5.

Die verschiedenen Funktionen des Seminalplasmas seien hier nur kurz angerissen: Transportmedium und Energielieferant für die Spermatozoen (Glucose, Fructose), Pufferung des sauren Vaginalsekretes, Funktion bei der Spermatozoenreifung, stimulierende Wirkung auf die Motilität der Spermatozoen, Verflüssigung des unmittelbar nach Ejakulation geronnenen Spermas und Begünstigung bei der Zervixmukuspenetration. Ganz im Vordergrund der Aufgaben des Seminalplasmas steht also das Zusammenwirken mit den Spermatozoen.

Wie bereits erwähnt, ist für die Motilität der Spermatozoen eine gewisse Calcium-Konzentration im Spermatozoon notwendig, damit diese eine koordinierte, vorwärtsgerichtete Bewegung ausführen können. Die These, daß das Seminalplasma Faktoren enthält, die den Calciumtransport durch die Spermatozoenplasmamembran regulieren, wird durch Entdeckungen solcher Faktoren unterstützt. BRADLEY und FORRESTER (1980) fanden in menschlichem Seminalplasma ein Calmodulin-ähnliches Protein, das die $[Ca^{2+} Mg^{2+}]ATPase$ der Erythrocytenmembran aktiviert.

Dieses Protein - Calmodulin oder Calmodulin-ähnlich - könnte für die zunehmende Impermeabilität für Calcium in den ejakulierten Spermatozoen verantwortlich sein. Indem dieses Protein mit der $[Ca^{2+} Mg^{2+}]ATPase$ der Spermatozoenplasmamembran reagiert und die Calciumkonzentration im Spermatozoon herabsetzt, wird eine koordinierte Schwanzbewegung erzielt, die eine vorwärtsgerichtete Bewegung bedeutet. Die gleiche Bedeutung, die Stimulierung dieser ATPase der Plasma-

membran mit den Auswirkungen auf die Motilität, wurde einem hitzestabilen, sauren Protein zugeschrieben, welches - Calcium-abhängig - eine Phosphodiesterase reguliert. Dieses Protein aus menschlichem Seminalplasma wurde Calsemin genannt, weist jedoch in vielen Punkten große Ähnlichkeit mit Calmodulin auf (s. III.5.). Die Entdecker selbst vermuten, daß Calsemin mit den von ACOTT und HOSKINS (1981) beschriebenen "Forward Motility Protein" aus Seminalplasma von Rindern identisch ist, welches sich während der Nebenhodenpassage der Spermatozoen an deren Kopf binden soll. Ob nun Calmodulin, Calsemin und Forward Motility Protein identisch sind oder ähnliche Proteine darstellen, bleibt offen. Daß Calmodulin nicht nur im Seminalplasma vorhanden ist, sondern auch einige Funktionen besitzt, wird von einer Entdeckung aus jüngerer Zeit unterstrichen: Aus Seminalplasma vom Stier wurde ein basisches Protein isoliert, das Seminalplasmin, welches äußerst spezifisch die Funktionen von Calmodulin antagonisiert (GIETZEN et al. - 1985). Sowohl die Phosphodiesterase als auch die Ca^{2+} -ATPase werden spezifisch gehemmt. Es liegt in relativ hoher Konzentration im Seminalplasma vor ($< 25 \mu\text{M}$) und könnte außerdem antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit belegen das Vorhandensein von Calmodulin im (humanen) Seminalplasma, wobei eine gewisse Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper auch mit Calmodulin-ähnlichen Proteinen nicht ausgeschlossen werden kann. Da jedoch äußerst spezifische Antikörper und hochauflösende Verfahren gewählt wurden, kann man wohl davon ausgehen, nur gering verfälschte Meßergebnisse und Isolierungsergebnisse erhalten zu haben (HOFFMANN, TOEPFER-PETERSEN, SCHILL: Calmodulin im Seminalplasma - Hinweise auf Beeinflussung der Spermatozoenmotilität; in Vorbereitung).

VI.5. Calmodulin in Prostasomen

STEGMAYR und RONQUIST isolierten 1982 aus Seminalplasma des Menschen eine Membranvesikelfraktion, die in vitro einen positiven Effekt auf die Motilität humaner Spermatozoen hatte.

Sie nannten diese Vesikel Prostasomen. Die Prostasomen enthalten Zink, Calcium und Magnesium in signifikant höheren Konzentrationen als das übrige Seminalplasma und beinahe dessen gesamte Mg^{2+} -ATPase-Aktivität. Außerdem beinhalten die Prostasomen, die wahrscheinlich aus der Prostata stammen, Angiotensin Converting Enzyme (KRASSNIGG et al. - 1983). Da, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ein Teil des sich im Seminalplasma befindlichen Calmodulin in den Prostasomen lokalisiert ist und die Prostasomen einen noch nicht näher geklärten Einfluß auf die Motilität menschlicher Spermatozoen besitzen, kann dieses Ergebnis als Unterstützung der in den vorigen Kapiteln angesprochenen Hypothesen angesehen werden: Calmodulin als Regulator der wechselnden Calciumdurchlässigkeit der Spermatozoenplasmamembran und somit Motilitätsbeeinflussung etc.

VI.6. Calmodulin in Splitejakulaten

Im Splitejakulat weisen normalerweise die in der ersten Portion des Ejakulates befindlichen Spermatozoen eine günstigere Motilität auf - verglichen mit der zweiten Portion -, wobei 2/3 der Spermatozoen sich in der ersten Hälfte befinden. Der Hauptsekretanteil der ersten Hälfte stammt aus der Prostata. Die von uns verwendeten Splitejakulate enthielten in ihren ersten Portionen ca. 2/3 der Gesamtspermatozoenzahl. Eine günstigere Motilität der Spermatozoen in Portion I

war jedoch nicht zu beobachten. Da kein Unterschied im Calmodulin-Gehalt der Fraktion I und II zu verzeichnen und die Motilität der beiden Fraktionen fast unverändert war, kann dies als Unterstützung der im Kapitel VI.2. aufgeführten These angesehen werden, Calmodulin sei in die Vorgänge der Motilität involviert.

Darüberhinaus wurde Fructose, die von den Bläschendrüssen sezerniert wird, im Seminalplasma der beiden Fraktionsgruppen bestimmt. In den jeweils II. Fraktionen konnten dabei leicht höhere Werte beobachtet werden (im Mittel lag der Unterschied bei ca. 2,0 mg%). Das Sekret der II. Fraktion des Splitejakulates stammt hauptsächlich aus den Bläschendrüssen und weist keine Differenz im Calmodulin-Gehalt zur I. Fraktion auf, deren Sekret hauptsächlich von der Prostata gebildet wird. Es ist also zu vermuten, daß Calmodulin sowohl von der Prostata als auch von den Bläschendrüssen sezerniert wird. Ob es sich beim Calmodulin der Bläschendrüssen vor allem um das "freie" Calmodulin handelt, im Gegensatz zu dem in den Prostatasomen lokalisierten Calmodulin der Prostata, bleibt reine Spekulation. Ebenso Erklärungsversuche der Tatsache, daß sowohl Fraktion I als auch Fraktion II der Splitejakulate im Seminalplasma höhere Calmodulinmengen aufwiesen als Seminalplasmen aus Gesamtejakulaten. Entweder liegt ein methodischer Fehler vor oder - sieht man davon ab - es kommt erst beim Zusammenwirken aller Sekrete des Ejakulates zu den im Gesamtejakulat auftretenden Konzentrationen an Calmodulin, wenn evtl. vorhandene "Anti-Calmoduline" eines Sekretanteiles einen gewissen Prozentsatz an Calmodulin abfangen.

Als höchst unbedeutend, wenn nicht unwahrscheinlich, kann die These angesehen werden, Calmodulin stamme - wenigstens zum Teil - aus dem Blutserum. Wie gezeigt werden konnte, wies das Blutserum an Normalpersonen nur den 5. - 6. Teil an Calmodulin auf, verglichen mit Calmodulin aus Seminalplasma. Der Weg des Calmodulin aus dem Blutserum über die Blut-Seminalplasma-Schranke in das Seminalplasma ist daher außerordentlich unwahrscheinlich.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Calmodulin, ein hitzestabiles, saures calciumbindendes Protein, das zu der Gruppe der konservativen Proteine gehört, wurde bislang in zahlreichen Geweben nachgewiesen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Vorkommen, der Lokalisation und der Isolierung von Calmodulin aus verschiedenen Fraktionen des humanen Ejakulates.

Dabei fand man nach Auftrennung der Ejakulate in Spermatozoen- und Seminalplasmafraktionen in letzterer die 11-13fache Menge an Calmodulin. Ein statistischer Zusammenhang zwischen den gemessenen Calmodulin-Werten der Spermatozoen- bzw. der Seminalplasmafraktionen und der Zahl, der Morphologie und der Motilität der Spermatozoen ließ sich nicht ermitteln. Der Hauptanteil des im Ejakulat vorhandenen Calmodulin befindet sich also im Seminalplasma, wobei gezeigt werden konnte, daß ein Teil des Seminalplasma-Calmodulins an die Prostatosomen gebunden ist. Über die möglichen Funktionen von Calmodulin im Seminalplasma lassen sich nur begrenzte Aussagen treffen. So ist ein motilitätsbeeinflussender Effekt denkbar. Darüberhinaus wurden bislang einige beinahe identische Proteine des Seminalplasmas beschrieben, die evtl. mit Calmodulin gleichzusetzen sind oder zumindest große Ähnlichkeit mit diesem Protein besitzen. In den beiden Seminalplasmafraktionen von Splitejakulaten fand sich eine fast doppelt so hohe Menge an Calmodulin als man im gesamten Seminalplasma eines Ejakulates messen konnte; ein signifikanter Unterschied der beiden Fraktionengruppen ließ sich nicht beobachten. Somit wird Calmodulin in den Sekreten aller akzessorischer Geschlechtsdrüsen gefunden.

Mittels Immunfluoreszenz ließ sich Calmodulin am Akrosom, am Äquatorialssegment und am Ansatzstück des Schwanzes nachweisen. Aufgrund dieser Beobachtungen sowie bereits bekannter Forschungsergebnisse kann Calmodulin bei der Kapazitation, der Akrosomreaktion und der Motilität der Spermatozoen sowie der Spermatozoen-Ei-Fusion mit großer Wahrscheinlichkeit als Calcium-Regulator angesehen werden und somit entscheidende regulatorische Funktionen bei diesen Prozessen innehaben. Außerdem wurde Calmodulin in den Seren von Normalpersonen und von polytraumatisierten Patienten gemessen, wobei sich in Seren von Normalpersonen geringfügig mehr Calmodulin (ca. 2 ng) nachweisen ließ. Über die Funktion von Calmodulin im Serum ist bislang noch nichts bekannt.

Schließlich gelang es, aus einem Pool von menschlichen Seminalplasmen mittels einer Reihe von Säulenchromatographien (HPLC) Calmodulin aus humanem Seminalplasma zu isolieren.

Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, daß der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) eine zuverlässige, hochempfindliche Methode mit geringem labor-technischem Aufwand darstellt und in der Lage ist, den aufwendigeren und umweltbelastenden Radio Immuno Assay zu ersetzen.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Acott, T.S. and D.D. Hoskins. 1981. Bovine sperm forward motility protein: Binding to epididymal spermatozoa. Biol. of. Reprod.. 24, 234-240.
- Adelstein, R.S. and C.B. Klee. 1981. Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. J. Biol. Chem. 256, 7501-7509.
- Bradley, M.P. and I.T. Forrester. 1980. A sodium-calcium exchange mechanism in plasma membrane vesicles isolated from ram sperm flagella. Febs letters. 121, 15-18.
- Bradley, M.P. and I.T. Forrester. 1980. A[Ca²⁺+Mg²⁺]-ATPase in epididymal and ejaculated sperm flagellar plasma membranes: possible modulation by extracellular factors. Cell Calcium. 1, 381- 390.
- Bradley, M.P. and I.T. Forrester. 1982. Human and ram seminal plasma both contain a calcium-dependent regulator protein Calsemin. J. Androl. 3, 289-296.
- Boström, S.L. B. Ljung, S. Mardh, S. Forsen and E. Thulin. 1981. Interaction of the antihypertensive drug felodipine in calmodulin. Nature, 292, 777-778.
- Brokaw, C.J. and S.M. Nagayama. 1985. Modulation of the asymmetry of sea urchin sperm flagellar bending by calmodulin. J. of Cell. Biol. 100, 1875-1883.
- Conti, M.A. and R.S. Adelstein. 1981. The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3:5' cAMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 256, 3178-3181.

- Chafouleas, J.G., J.R. Dedman, R.P. Munjaal and A.R. Means. 1979. Calmodulin. Development and application of a sensitive radio immuno assay. J. Biol. Chem. 254, 10262-10267.
- Crouch, T.H. and C.B. Klee. 1980. Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin. Biochem. 19, 3692-3698.
- Cox, J.A., A. Maln  e and E.A. Stein, 1981. Regulation of brain cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin. J. Biol. Chem. 256, 3218-3222.
- Carafoli, E. V. Niggli, K. Malmström and P. Caroni. 1980. Calmodulin in natural and reconstituted calcium transporting systems. Ann. N.Y. Acad. Sci. 356, 258-266.
- Delville, A. J. Grandjean, P. Laszlo, C. Gerday, H. Brzeska and W. Drabikowski. 1980. Sodium - 23 nuclear magnetic resonance as an indicator of sodium binding to calmodulin and tryptic fragments, in relation to calcium content. Eur.J. of Biochem. 109, 515-522.
- De Mey, J., M. Moevemans, G. Geuens, R. Nuydens, H. Van Belle and De Brabander. 1980. Microtubule and microtubule inhibitors. ed: De Brabander and De Mey, Amsterdam. pp. 227-241.
- Cordeladze, J.O., M. Conti, K. Purvis and V. Hansson. 1982. The effect of calmodulin, trifluoperazine and other psychoactive drugs on the activity of the Mn^{2+} -dependent adenyl cyclase (AC) in testicular germ cells. Internat. J. Androl. 5, 103-112.
- Gietzen, K. and H.-J. Galla. 1985. Seminalplasmin, an endogenous calmodulin antagonist. Biochem. J. 230, 277-280.
- Garbers, D.L., J.R. Hansbrough, E.W. Radany, R.V. Hyne and G.S. Kopf. 1980. Purifikation and

- charakterization of calmodulin from sea urchin spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 59, 377- 381.
- Guerini, D. and J. Krebs. 1985. Separation of various calmodulins, calmodulin tryptic fragments, and different homologous Ca^{2+} -binding proteins by reversed phase, hydrophobic interaction, and ion-exchange high-performance liquid chromatography techniques. Analyt. Biochem. 150, 178-187.
- Gnegny, M.E., J.A. Nathanson and P. Uzunof. 1977. Release of the phosphodiesterase activator by cyclic AMP-dependent ATP: Protein phosphotransferase from subcellular fractions of rat brain. Biochem. Biophys. Acta. 479, 75-85.
- Grand, R.J.A. and S.V. Perry. 1979. Calmodulin-binding proteins from brain and other tissues. Biochem. J. 183, 285-295.
- Hincke, M.T. and J.G. Demaille. 1984. Calmodulin regulation of the ATP-dependent calcium uptake by inverted vesicles prepared from rabbit synaptosomal plasma membranes. Biochem. Biophys. Acta. 771, 188-194.
- Haiech, J., C.B. Klee and J.G. Demaille. 1981. Effects of cations on affinity of calmodulin for calcium: Ordered binding of calcium ions allows the specific activation of calmodulin-stimulated enzymes. Biochem. 20, 3890-3897.
- Hoffmann, J.M., Toepfer-Petersen, E., Schill, W.-B. Calmodulin im Seminalplasma - Hinweise auf Beeinflussung der Spermatozoenmotilität, in Vorbereitung.

- Itano, T., R. Itano and J.T. Penniston. 1980. Interactions of basic polypeptides and proteins with calmodulin. *Biochem. J.* 189, 455-459.
- Jones, H.P., R.W. Lenz, B.A. Palevitz and M.J. Cormier. 1980. Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Cell. Biol.* 77, 2772-2776.
- Jamieson, G.A. Jr. and T.C. Vanaman. 1979. Calcium-dependent affinity chromatography of calmodulin on an immobilized phenothiazine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1048-1956.
- Kretsinger, R.H. 1976. Calcium-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 45, 239-266.
- Kuo, I.C.Y. and C.J. Coffee. 1976. Purification and characterization of a troponin-C-like protein from bovine adrenal medulla. *J. Biol. Chem.* 251, 1603-1609.
- Kilhoffer, M.C., J.G. Demaille and D. Gerard. 1981. Tyrosine fluorescence of ram testis and octopus calmodulins. Effects of calcium, magnesium and ionic strength. *Biochem.* 20, 4407-4414.
- Kuznicki, J., Z. Grabarek, H. Brzeska, W. Drabikowski and P. Cohen. 1981. Stimulation of enzyme activities by fragments of calmodulin. *Febs letters* 130, 141-145.
- Klee, C.B. and J. Haiech. 1980. Concerted role of calmodulin and calcineurin in calcium regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 356, 43-54.
- Keller, C.H., D.C. LaPorte, W.A. Toscano Jr., D.R. Storm and K.R. Westcott. 1980. Ca^{2+} -regulation of cyclic nucleotide metabolism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 356, 205-219.

- Klevit, R.E. B.A. Levine and R.P.J. Williams. 1981. A study of calmodulin and its interaction with trifluoperazine by high resolution HNMR spectroscopy. *Febs letters*. 123, 25-29.
- Kazazoglou, Th., R.W. Schackmann, M. Fosset and B. Shapiro. 1985. Calcium channel antagonists inhibit the acrosome reaction and bind to plasma membranes of sea urchin sperm. *Cell Biol*. 82, 1460-1464.
- Kakiuchi, S., K. Sobue, R. Yamazaki, S. Nago, S. Ume-ki, Y. Nozawa, M. Yazawa and K. Yagi. 1981. Ca^{2+} -dependent modulator proteins from *tetrahymena pyriformis*, sea anemone and scallop and guanylate cyclase activation. *J. Biol. Chem*. 256, 19-22.
- Klumpp, S., A.L. Steiner and J.E. Schultz. 1983. Immunocytochemical localization of cyclic GMP, cGMP-dependent protein kinase, calmodulin and calcineurin in *Paramecium tetraurelia*. *Eur. J. Cell Biol*. 32, 164-170.
- Krassnigg, F., E. Toepfer-Petersen, K. Sachse, I. Hackl, J. Frick and W.-B. Schill. 1983. Untersuchungen über den Einfluß prostaticher Faktoren auf die Spermatozoen-Motilität. *Fortschritte der Fertilitätsforschung* 12, Grosse Verlag, Berlin, pp. 164-169.
- LaPorte, D.C., B.M. Wierman and D.R. Storm. 1980. Calcium-induced exposure of a hydrophobic surface on calmodulin. *Biochem*. 19, 3814-3819.
- Means, A.R. and J.R. Dedman. 1980. Calmodulin - an intracellular calcium receptor. *Nature*. 285, 73-77.

- Marcum, J.M., J.R. Dedman, B.R. Brinkley and A.R. Means. 1979. Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proc.Natl.Acad. Sci.* 75, 3771-3775.
- McCubbin, W.D., M.T. Hincke and C.M. Kay. 1979. The utility of the nitrotyrosine chromophore as a spectroscopic probe in troponinC and modulator protein. *Can. J. Biochem.* 57, 15-20.
- Niggli, V., E.S. Adunyah and E. Carafoli. 1981. Acidic phospholipides, unsaturated fatty acids and limited proteolysis mimic of the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 256, 8588-8592.
- Ogawa, Y. and M. Tanokura. 1984. Calcium binding to calmodulin: effects of ionic strength, Mg^{2+} , pH and temperature. *J. Biochem.* 95, 19-28.
- Picton, C., C.B. Klee and P. Cohen. 1980. Phosphorylase Kinase from rabbit skeletal muscle: identification of the calmodulin-binding subunits. *Eur. J. Biochem.* 111, 553-561.
- Plascik, M.T., P.L. Wisler, C.L. Johnson and J.D. Potter. 1980. Ca^{2+} -dependent regulation of guinea pig brain adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 255, 4176-4181.
- Roufogalis, B.D. 1981. Phenoethiazine antagonism of calmodulin: A structurally-nonspecific interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 607-613.
- Singh, J.P., F. Donner, D.F. Babcock and H.A. Lardy. 1978. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochem. J.* 172, 549-556.
- Szebenyi, D.M.E., S.K. Obendorf and K. Moffat., 1981. Structure of vitamin D-dependent calcium-binding protein from bovine intestine. *Nature* 294, 327-332.

- Stegmayr, B. and G. Ronquist. 1982. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol. Res.* 10, 253-257.
- Tash, J.S. and A.R. Means. 1983. Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol. of Reprod.* 28, 75-104.
- Thiry, P., A. Vandermeers, M.C. Vandermeers-Piret, J. Rathe and J. Christophe. 1980. The activation of brain adenylate cyclase and brain cyclic-nucleotide phosphodiesterase by seven calmodulin derivatives. *Europ. J. Biochem.* 103, 409-414.
- Van Eldik, L.J. and D.M. Watterson. 1981. Reproducible production of antiserum against vertebrate calmodulin and determination of the immunoreactive site. *J. Biol. Chem.* 256, 4205-4210.
- Van Eldik, L.J., D.M. Watterson, K.-F. Fok and B.W. Erickson. 1983. Elucidation of a minimal immunoreactive site of vertebrate calmodulin. *Archiv. Biochem. Biophys.* 227, 522-533.
- Welsh, M.J., J.C. Aster, M. Ireland, J. Alcala and H. Maisel. 1982. Calmodulin binds to chick lens gap junction protein in a calcium-independent manner. *Science.* 216, 642-645.
- Wolff, D.J. and C.D. Brostrom. 1979. Properties and functions of the calcium-dependent regulator protein. *Adv. Cyclic Nucl. Res.* 11, 27-88.
- Wolff, D.J., J. M. Ross, P.N. Thompson, M.A. Brostrom and C.O. Brostrom. 1981. Interaction of calmodulin with histones. *J. Biol. Chem.* 256, 1846-1860.

IX. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr.med. W.-B. Schill danke ich für die Überlassung des Themas. Mein Dank gilt außerdem Frau Dr.rer.nat. E. Toepfer-Petersen für die Unterstützung der experimentellen Arbeit.

XI. LEBENSLAUF

- 22.3.1958 Geburt in Augsburg als einziges Kind von
Walburga Maria Hackl, geborene Schmid, und
von Erwin Hackl
- 1964-1969 Besuch der Volksschule in Gersthofen
- 1969-1978 Besuch des Maria-Theresia-Gymnasiums in
Augsburg, (mathematisch-naturwissenschaft-
licher Zweig)
- 1978 Abitur
- Mai 1979 Beginn des Medizinstudiums an der Ludwigs-
Maximilians-Universität in München.
- März 1981 Physikum
- August 1982 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- März 1984 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- Mai 1985 Erteilung der Approbation
- Juli 1985 Verehelichung mit Dr.med. Artur Hoffmann

